

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie,
Klinische Immunologie und Humangenetik
und
dem Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus
des Pharma-Forschungszentrums der Bayer AG, Wuppertal

Die Bestimmung des Wasserstoffperoxids
und der Peroxidase mit 2,2'-Azino-di-
[3-äthylbenzthiazolin-sulfonsäure-(6)]

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Reinhild Becker
aus Plettenberg

Gießen 1974

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie,
Klinische Immunologie und Humangenetik
und
dem Institut für Pharmakokinetik und Metabolismus
des Pharma-Forschungszentrums der Bayer AG, Wuppertal

Die Bestimmung des Wasserstoffperoxids und der Peroxidase mit 2,2'-Azino-di- [3-äthylbenzthiazolin-sulfonsäure-(6)]

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Bereichs Humanmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Reinhild Becker
aus Plettenberg

Gießen 1974



Dekan: Prof. Dr. D. Ringleb

Betreuer Prof. Dr. J. Pütter
der Arbeit:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. Róka
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. L. Lumper

MEINEN LIEBEN ELTERN

I N H A L T

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I - III
Abkürzungen und Symbole	IV
A. <u>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</u>	1 - 4
B. <u>EINLEITUNG</u>	5
C. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	8
I. <u>REAGENZIIEN UND GERÄTE</u>	8
a) Reagenzien	8 - 10
b) Geräte	10
II. <u>ALLGEMEINE METHODEN</u>	10
a) Experimentelle Methoden	10
1) Gehaltsbestimmung der H_2O_2 -Lösung	10 - 11
2) Maßnahmen bei den Enzymbestimmungen	11 - 12
3) Wahl der Volumina	12
b) Statistische Methoden	12 - 13
D. <u>ERGEBNISSE</u>	14
I. <u>BESTIMMUNG DES H_2O_2</u>	14
a) Festlegung der Bedingungen zur Bestimmung des H_2O_2	15 - 24
b) H_2O_2 -Eichkurve bei pH 7,0 und Bestimmung des Eichfaktors	25 - 29

II

	Seite
c) Empfindlichkeit der Bestimmung des H_2O_2	29 - 30
d) Untere Nachweisgrenze von H_2O_2 und relative Standardabweichung von Leerwert und Analyse	30 - 33
e) Präzision der Bestimmung des H_2O_2	33 - 34
 II. <u>BESTIMMUNG DER PEROXIDASE</u>	 34
a) Haltbarkeit von reinen Meerrettich- und Lacto-Peroxidase Lösungen	35 - 37
b) Optimale H_2O_2 -Konzentration	37 - 43
c) Stabilität der $10^{-2}M$ H_2O_2 -Lösung	43 - 44
d) Bestimmung der Aktivität der Meerrettich-Peroxidase _{II} bei verschiedenen Substratkonzentrationen	44 - 46
1) Vorversuch	46 - 51
2) Bestimmung der Michaelis-Konstanten bei pH 7,0	51 - 59
3) Bestimmung der Michaelis-Konstanten bei pH 6,0	60 - 63
4) Übersicht: Michaelis-Konstanten für ABTS und H_2O_2 bei pH 7,0 und 6,0	64 - 65
e) pH-Optimum der Peroxidase-Aktivität	65 - 73
f) Vorgeschlagene Methode zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität	73 - 74
g) Eichkurven der Meerrettich- und Lacto-Peroxidasen	75 - 85
h) Empfindlichkeit der Bestimmung der Peroxidase	85 - 86

III

	Seite
i) Untere Nachweisgrenze von Meerrettich-Peroxidase und relative Standardabweichung von Leerwert und Analyse	86 - 89
j) Präzision der Bestimmung der Meerrettich-Peroxidase _I	89 - 90
E. <u>DISKUSSION</u>	91 - 98
F. <u>LITERATUR</u>	99 - 104

ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

=====

A =	Analyse
ABTS =	2,2'-Azino-di- [3-äthyl-benzthiazolin-sulfon- säure-(6)], kristall. Diammoniumsalz
C =	Konzentration
D =	Donator
E =	Extinktion
ϵ =	Extinktionskoeffizient
Konz. =	Konzentration
L =	Leerwert
Lsg. =	Lösung
M =	molar
Meer. =	Meerrettich
N =	normal
n =	Stichprobenumfang
OS =	Oxalsäure
p =	Irrtumswahrscheinlichkeit (probability)
PO _I =	Meerrettich-Peroxidase, Reinheitsgrad I
PO _{II} =	Meerrettich-Peroxidase, Reinheitsgrad II
[S] =	Substratkonzentration
U (unit) =	Enzymeinheit; diejenige Menge eines jeden Enzyms, die unter Standardbedingungen die Umwandlung eines μ Mols Substrat pro min katalysiert. [1]
v =	Substratumsatzgeschwindigkeit $\frac{\mu \text{ Mol Substrat}}{\text{min}}$
V =	Volumen

A. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe eines neuen Peroxidase-Substrats, dem ABTS = 2,2'-Azino-di-[3-äthyl-benzthiazolin -sulfonsäure-(6)], Diammoniumsalz, wurde eine Bestimmungsmethode für H_2O_2 und Peroxidase (PO)⁺ erarbeitet.

Getestet wurden die Meer.-PO und (stellvertretend für tierische Peroxidasen) die Lacto-PO. Bei Verwendung der Meer.-PO fanden 2 verschieden gereinigte Enzympräparate Anwendung. Das Substrat, ein Leukofarbstoff, erwies sich aus mehreren Gründen zur Bestimmung verwendbar:

Im Absorptions-Spektrum zeigte es ein Optimum bei einer günstigen Wellenlänge (sichtbarer Bereich); bei genügend hoher Konzentration ergab sich eine gute Stabilität; die untere Nachweisgrenze war sowohl für H_2O_2 (ca. $2 \cdot 10^{-7} M$) als auch für PO_I (0,1 ng pro ml) niedrig. Für die relative Standardabweichung der Bestimmung des H_2O_2 ergab sich im günstigen Meßbereich 0,5 %; für die der PO-Bestimmung 1,9 %. Das reduzierte ABTS blieb über längere Zeit konstant.

Um eine Methode empfehlen zu können, die unter optimalen Reaktionsbedingungen mißt, wurde das Verhalten der PO-Aktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen und pH-Werten getestet. Es ergab sich, daß die K_M für H_2O_2 von der Konzentration des 2. Substrates, des ABTS, abhängig war, wie umgekehrt die K_M für ABTS von der H_2O_2 -Konzentration abhing.

⁺Für den Begriff Peroxidase wird in der Literatur von einigen Autoren [2, 3, 4, 5] die Abkürzung POD gebraucht, während hier zusammen mit anderen [6, 7, 8] der Ausdruck PO Anwendung findet.

Die Nachteile der bisher verwandten Farbstoffe zur PO-Bestimmung (Entstehung von 2 unterschiedlichen Reaktionsprodukten bei Guajakol; Kanzerogenität, Instabilität und vergleichbar geringe Empfindlichkeit des o-Dianisidins) sind bei ABTS nicht vorhanden bzw. nicht erwiesen.

Von einigen Autoren [2, 3, 4] ist ABTS bereits zur Blutzuckerbestimmung beschrieben worden.

Aufgrund der eigenen Versuche läßt sich sagen, daß ABTS auch zur PO-Bestimmung geeignet ist.

SUMMARY

By means of a new peroxidase-substrate, ABTS = 2,2' - azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulfonate-6]], diammonium salt, a new method of determination for H_2O_2 and peroxidase (PO)⁺ was elaborated.

Two various kinds of PO were tested: horseradish-PO, and (for the animal Peroxidases) lacto-PO. By using horseradish-PO two differently purified enzyme preparations were used. The substrate, a leuko-dye, was proved to be useful for the determination of H_2O_2 and peroxidase for different reasons:

In the absorption spectrum it showed an optimum at a suitable wave length (within the visible range); at a sufficient high concentration a good stability was reached; the lower limit of determination was very small for both H_2O_2 (ca. $2 \cdot 10^{-7}M$) and peroxidase (0,2 ng PO).

The standard error of the determination of H_2O_2 in the optimal concentration range was found to be 0,5% of the mean value; for that of the PO-determination it was 1,9%. The reduced ABTS extinction did not change for rather a long time.

To recommend a method which works under the most favourable reaction conditions the behavior of the PO-activity was tested at various substrate concentrations and pH-values.

⁺In literature, some authors [2, 3, 4, 5] shorten the term Peroxidase POD, while here together with others [6, 7, 8] the term PO is employed.

The K_M for H_2O_2 depended on the concentration of the second substrate, ABTS, whereas vice versa the K_M for ABTS was dependent from the H_2O_2 -concentration.

The disadvantages of the formerly used leuko dyes for the PO-determination (different reaction products formed by Guajakol; carcinogenicity, instability and comparatively low sensitivity of o-dianisidine) apparently do not exist by using ABTS.

By some authors [2, 3, 4] ABTS is already recommended for the blood-sugar determination. From our own experiments it can be concluded that ABTS may also be used successfully for the PO activity determination.

B. EINLEITUNG

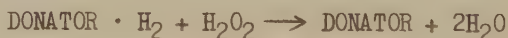
Die Bestimmung der Peroxidase ist für die pflanzliche und tierische Biologie sowie für die Medizin von Wichtigkeit, da das Enzym weit verbreitet ist.

Man findet die PO z.B. in Hefe [9], bei höheren Pflanzen besonders im Saft des Feigenbaums [8] und in der Wurzel des Meerrettichs [8]; beim Menschen in den Leukozyten [10, 11, 12], speziell in den eosinophilen Granulozyten [6] und der Milch [13, 14, 15, 16, 17, 18], ferner in Leber [8] und Niere [8], Speichel [19] und NN-Mark [20].

In der Medizin wird die PO beispielsweise zur differentiellen Anfärbung von Leukozyten verwandt [21], zum Nachweis von occultem Blut [22] und zur Charakterisierung von Krankheitszuständen in der experimentellen Pathologie [23], ferner zur Bestimmung der Blut-Glucose [24, 25], Galaktose [26] und Katalase [27].

Darum ist eine möglichst genaue Bestimmung von Interesse.

Die PO katalysiert die Dehydrogenierung vieler organischer Substanzen nach dem Schema:



Nach obiger Gleichung kann die PO auf 3 verschiedene Arten bestimmt werden [28], und zwar durch Messung der

- 1) Abnahme der H_2O_2
- 2) Abnahme des Wasserstoff-Donators
- 3) Entstehung einer dehydrogenierten Verbindung.

Die am meisten gebräuchliche Methode ist die letzte, die üblicherweise photometrisch durchgeführt wird und bei der nach Saunders et al [29] für das verwendete Substrat folgende Ei-

enschaften zu fordern wären:

- I) Geringe Autoxidation oder Oxidation durch andere Enzyme.
- II) Oxidation zu einem einzigen Reaktionsprodukt, das dann keine Sekundärreaktionen, z.B. Hydrolyse, eingehen darf.
- III) Geringe pH-Abhängigkeit bei der Reaktion.
- IV) Leicht vornehmbare quantitative Bestimmung, möglichst schon bei geringen Substratkonzentrationen.
- V) Gute Löslichkeitseigenschaften.
- VI) Zuverlässige und einfache Reindarstellung.

Später forderten Gawehn et al [2] ergänzend für das zur PO-Bestimmung optimale Substrat:

- VII) Vorhandensein einer Absorptionsbande des Oxidationsproduktes im sichtbaren Bereich.

Als letzte Punkte blieben noch zu ergänzen, daß

- VIII) eine möglichst geringe nicht-enzymatische Oxidation stattfinden sollte und
- IX) das Laborpersonal nicht durch giftige Reagenzien gefährdet werden sollte.

Von den in der Vergangenheit verwendeten Substraten genügten Luminol, Benzidin und Triphenylmethan den oben genannten Kriterien so wenig, daß sie höchstens zur qualitativen PO-Bestimmung verwandt werden konnten. Dasselbe trifft für o- und p-Phenylendiamin, für 1-Naphtol und für Hydrochinon zu.

Zur quantitativen PO-Bestimmung fand Pyrogallol bis 1964 am häufigsten Anwendung. Willstätter und Stoll [30] maßen die

PO-Aktivität in der Purpurogallinzahl⁺. Diese Methode erfüllte aber nicht die Bedingung III und erwies sich darüber hinaus als für die Versuchsbedingungen zu eng begrenzt.

Als geeignetster H₂-Donator wurde bis zu dieser Zeit das Mesidin angesehen. Später stellte sich jedoch heraus, daß es den Kriterien I und II nicht entsprach.

Das heute manchmal angewandte o-Toluidin weist diese Nachteile nicht auf, jedoch verhält es sich im Hinblick auf die Punkte IV und VII ungünstig. Darüber hinaus ist es als Derivat des Benzidins wahrscheinlich kanzerogen.

Bei der PO-Bestimmung mit dem heute gebräuchlichen o-Dianisidin erhält man zwar sehr genaue Werte, aber die Substanz ist wie Benzidin kanzerogen [28]. Außerdem erfährt sie beim Stehenlassen eine quantitative und qualitative Änderung der Extinktion [24, 27].

Das 1970 von Pütter [28] als vorläufige Alternative zum o-Dianisidin empfohlene Guajakol wurde häufig als H₂-Donator angewandt; es liefert jedoch kein einheitliches Reaktionsprodukt [31, 32] (vgl. II).

Über die beschriebenen Substanzen läßt sich also sagen, daß bisher noch kein idealer H₂-Donator gefunden worden ist. Darum soll das ABTS, das möglicherweise die Bedingungen I-IX in idealer Weise erfüllt und dessen Brauchbarkeit für die Blutzuckerbestimmung erwiesen ist [3], auf seine Brauchbarkeit bei der Bestimmung des H₂O₂ und der PO untersucht werden.

⁺Purpurogallinzahl (P.Z.) = diejenige Menge Purpurogallin, die von 1 mg PO unter genau definierten Bedingungen aus Pyrogallol gebildet wird.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. Reagenzien und Geräte

a) Reagenzien

Alle Reagenzien wurden in aq. bidest. gelöst.

1) H₂O₂

Es wurde eine 0,1 M H₂O₂-Stammlösung (p.a., Ferak Chemikalien, Berlin) hergestellt, von der aus die gewünschten Konzentrationen durch weitere Verdünnung entstanden. Die 0,1 M H₂O₂-Stammlösung wurde jeden Tag mit 0,1 N KMnO₄ titriert (p.a., E. Merck AG Darmstadt, Kat.-Nr. 9935) die 0,1 N KMnO₄-Lsg. wöchentlich mit 0,1 N Oxalsäure 33 (p.a., E. Merck AG Darmstadt, Kat.-Nr. 9965).

2) Peroxidase (= PO) E.C. No. 1.11.1.7

Es wurden getestet:

d) Meerettich-PO (Boehringer Mannheim GmbH)

b) Lacto-PO (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA, Kat.-Nr. L 8503)

Zu 2):

Von der Meerrettich-PO wurden 2 verschiedene Reinheitsgrade verwandt:

Reinheitsgrad I (p.a., Suspension, 250 U/mg, Kat.-Nr. 15301)

Reinheitsgrad II (Lyophilisat, 50 U/mg, Kat.-Nr. 15302).

Im folgenden werden zur Abkürzung statt Merrettich-PO, Reinheitsgrad I, und PO, Reinheitsgrad

II, die Ausdrücke PO_{I} und PO_{II} verwandt.
 === =====

Für die meisten Versuche war es günstiger, die lyophilisierte PO_{II} statt der suspendierten PO_{I} zu nehmen, um eine größere Genauigkeit bei der Mengendosierung zu erreichen.

(Das Einwiegen der gefriergetrockneten Substanz ist genauer als das Pipettieren der Suspension, da diese nicht gleichmäßig gelöst ist; außerdem könnte sich bei der Suspension die Konzentration ändern, wenn H_2O verdampft).

Lediglich bei der Meerrettich-PO Eichkurve und der pH-Kurve fand die reinste PO Anwendung.

Zu B):

Stellvertretend für tierische Peroxidasen wurde die Lacto-PO getestet.

3) ABTS

Das in den Versuchen angewandte ABTS = 2,2'-Azinodi-[3-äthylbenzthiazolin-sulfonsäure-(6)], kristall. Diammoniumsalz, stellte die Firma Boehringer Mannheim GmbH zur Verfügung (Kat.-Nr. 15594).

4) Pufferlösungen

Alle Reagenzien wurden in $\frac{\text{M}}{15}$ Puffer (p.a., E. Merck AG, Darmstadt) des jeweiligen pH gelöst. Bei den pH-Versuchen der Meerrettich-PO wurden für die ganzzahligen pH-Werte (pH 3,4,5,6,7,8) fertige Puffer-Titrisole verwandt (Kat.-Nr. 9883-9888). Bei den pH-Versuchen der Lacto-PO (pH-Bereich 5,6-7,8) wurden ausschließlich $\frac{\text{M}}{15}$ Phosphatpuffer nach Sørensen ge-

nommen, die nach Stauff und Jaenicke [34] hergestellt wurden (Kat.-Nr. 8473 und 6580).

b) Geräte

Die Absorptionsspektren des oxidierten und reduzierten ABTS wurden gemessen im Zeiss-Photometer (PMQ II), die Messungen bei 405 nm im Eppendorff-Filter-Photometer (Gerät Nr. M 11726196). Bei allen Versuchen fanden Küvetten mit 10,0 mm Schichtdicke Anwendung; für den UV-Bereich aus Quarz, für den sichtbaren Bereich aus optischem Spezialglas.

Die ABTS- und Puffer-Trockensubstanzen wurden auf der Halbmikrowaage (Typ B 6. E. Mettler, Zürich), die lyophilisierte PO auf der Mikrowaage (Typ M 5. E. Mettler, Zürich) eingewogen.

Zur Abmessung der Volumina der Reagenzien dienten Mikropipetten Marburg mit 10, 20, 50, 100, 200, 500 und 1000 μl (Eppendorff-Gerätebau).

Für die Ausrechnung der Werte stand ein Wang-Tischrechner (Modell 600/14/T/P. Wang Laboratories GmbH, Twesksbury, Mass. USA) zur Verfügung.

II. Allgemeine Methoden

a) Experimentelle Methoden

1) Gehaltsbestimmung der H_2O_2 -Lösung

α) Titration der H_2O_2 Stammlösung mit KMnO_4 :

4 ml H_2O_2 -Lsg. (mit 0,1 N KMnO_4 titriert)
 + 100 ml $\alpha\text{q. bidest}$
 + 10 ml konz. H_2SO_4 p.a.

Die Molarität der H_2O_2 -Stammlösung ergab sich nach der Formel:

$$M_{\text{H}_2\text{O}_2} = \frac{N_{\text{KMnO}_4} \cdot V_{\text{KMnO}_4}}{2 \cdot V_{\text{H}_2\text{O}_2}}$$

B) Titration von ca. 0,1 N KMnO_4 (p.a., E. Merck AG, Darmstadt) mit 0,1 N Oxalsäure (OS):

10 ml Oxalsäure	} wurden auf ca. 80°C	
+100 ml aq. bidest		erwärmt und dann ge-
+10 ml konz. H_2SO_4		gen KMnO_4 titriert.
p.a.		

Die Normalität des KMnO_4 ergab sich nach der Formel:

$$N_{\text{KMnO}_4} = \frac{V_{\text{OS}} \cdot N_{\text{OS}}}{V_{\text{KMnO}_4}}$$

2) Maßnahmen bei den Enzymbestimmungen

4) Temperatur

Da die Richtigkeit der Messung von Enzymaktivitäten in hohem Maß von der Temperatur abhängt [35] betrug die Temperatur bei allen Messungen 25° C. Die Reagenzien wurden (mit Ausnahme der PO) in einem Wasserbad von 25° C vorinkubiert. Während der Reaktion hielt ein temperierbarer Küvettenhalter im Photometer die Temperatur konstant.

β) Arbeiten mit sterilen Instrumenten

Um eine bakterielle Zersetzung der PO zu verhindern, wurden die jeweils gebrauchten Enzymmengen steril entnommen.

α) Spezielle Methoden zur Lacto-PO Bestimmung:

Da die Lacto-PO sehr schnell an Aktivität verliert, wurden bei Versuchen mit diesem Enzym besondere Maßnahmen ergriffen:

Die Lacto-PO Lsg. wurde in Eiswasser gelagert. Zeitlich hintereinanderfolgende Meßreihen wurden mit Hilfe eines Bezugswertes auf die Aktivität der Lacto-PO in der ersten Meßreihe umgerechnet. (Vgl. die Eich- und pH-Kurve der Lacto-PO, Abb. 17 u. 18).

3) Wahl der Volumina

Die Volumina der einzelnen Reagenzien wurden in den verschiedenen Versuchen so angeordnet, daß ein Pipettierfehler der zu bestimmenden Substanz möglichst klein ausfiel, d.h.: von der zu bestimmenden Substanz wurde ein möglichst großes Volumen genommen.

b) Statistische Methoden [36]

1) Lineare Regression

In den Lineweaver-Burk-Diagrammen [37] für die K_M -Bestimmungen wurde aus den gemessenen x, y-Wertepaaren die betr. Gerade mit Hilfe der Formel für die lineare Regression ermittelt:

$$Q_x = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}; \quad Q_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

$$b_y = \frac{Q_{xy}}{Q_x} \quad a = \frac{\sum y - b_y \sum x}{n}$$

Die Zeichnung der Geraden erfolgte mittels folgender errechneter Größen:

b_y = Steigung der Geraden

a = Ordinatenabschnitt

2) Standardabweichung

Die Standardabweichung der Leerwerte und Analysen errechneten sich nach der Formel:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

Die relative Standardabweichung ergab sich aus der Beziehung zum Mittelwert $\bar{x}$:

$$S \% = S \cdot \frac{100}{\bar{x}} \quad [38]$$

3) Signifikanz

Die Signifikanz wurde nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\hat{t} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n_1}} \quad \nu = 2n_1 - 2$$

Die Signifikanz p wurde aus der Tabelle mit Hilfe des Wertes $\hat{t}$ entnommen.

D. ERGEBNISSE

I. Bestimmung des H_2O_2

Es sollen zunächst diejenigen Bedingungen herausgefunden werden, die zur H_2O_2 -Bestimmung optimal sind. Dazu zählen u.a.:

die optimale Wellenlänge und
die optimale ABTS-Konzentration.

Die optimale Wellenlänge wurde bei zunächst noch nicht endgültig festgelegter ABTS-Konzentration bestimmt [a) 1)] .

Bei dem sich in diesem Versuch ergebenden Wellenlängen-Optimum soll dann im folgenden Versuch die optimale ABTS-Konzentration festgelegt werden [a) 2)] .

Nach Festlegung der ABTS-Konzentration wurde die empfohlene Konzentration in ihrer Haltbarkeit getestet [a) 3)] .

Danach soll eine Zusammenfassung der Bedingungen gegeben werden, unter denen die H_2O_2 -Bestimmung am günstigsten ist [a) 4)] .

Nach Festlegung der Bedingungen wurde die H_2O_2 -Eichkurve angefertigt und daraus der Eichfaktor bestimmt [b)] .

Zum Ende des Kapitels " H_2O_2 -Bestimmung" schließt sich der Test auf die Empfindlichkeit dieser Methode an [c)] , ferner die Festlegung der unteren Nachweisgrenze von H_2O_2 und der Präzision [d)] .

a) Festlegung der Bedingungen zur Bestimmung
des H_2O_2

1) Absorptions-Spektren des oxidierten und
nicht oxidierten ABTS

Für die späteren Messungen soll diejenige
Wellenlänge bestimmt werden, bei der das
oxidierte ABTS ein Absorptionsmaximum hat.
Dazu fertigten wir ein Spektrum an, und zwar
zunächst mit ABTS- und H_2O_2 -Konzentrationen,
die noch nicht den endgültigen entsprachen.

Alle Ansätze wurden frühestens nach 4', spä-
testens nach 15' gemessen.

ANSATZ:

ANALYSE:

2 ml PO_{II} -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_{\text{II}}/\text{ml}$ Phosphatpuf-
fer pH 7,0)

0,2 ml $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ABTS in ml Phosphatpuffer
pH 7,0

0,2 ml 10^{-4}M H_2O_2 in ml Phosphatpuffer
pH 7,0

LEERWERT:

2 ml PO_{II} -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_{\text{II}}/\text{ml}$ Phosphatpuffer
pH 7,0)

0,2 ml $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH
7,0

0,2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

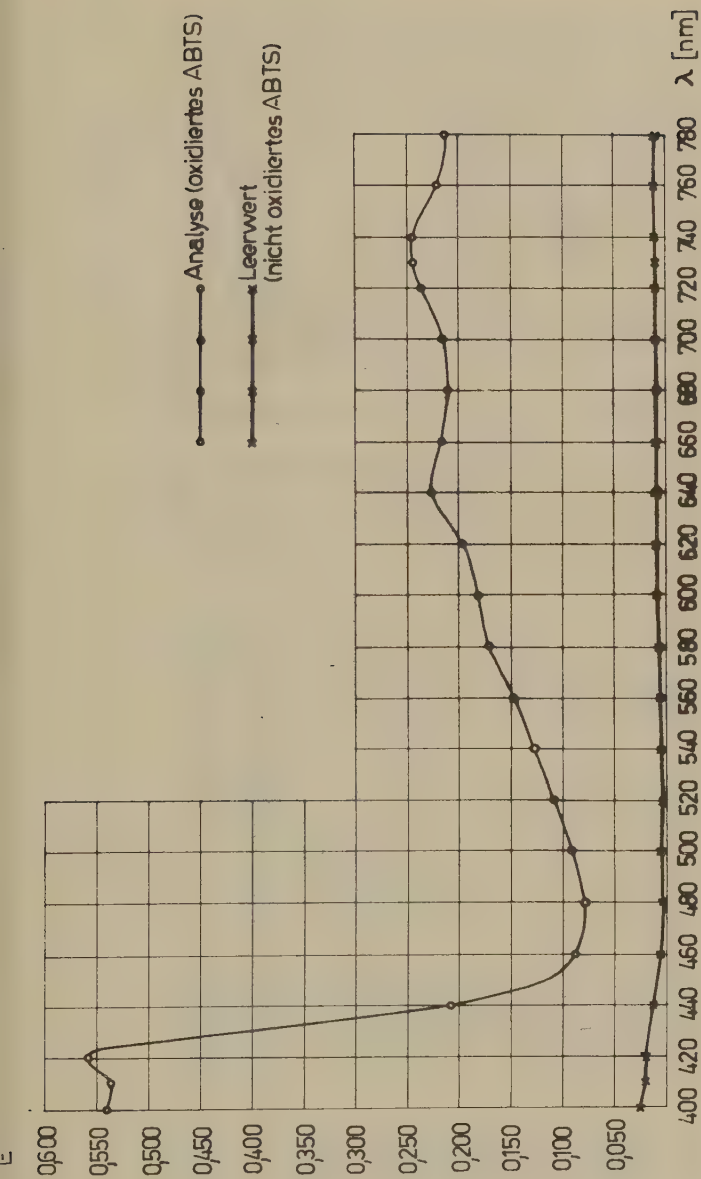


Abb. 1: Absorptions-Spektren des oxidierten und nicht oxidierten ABTS

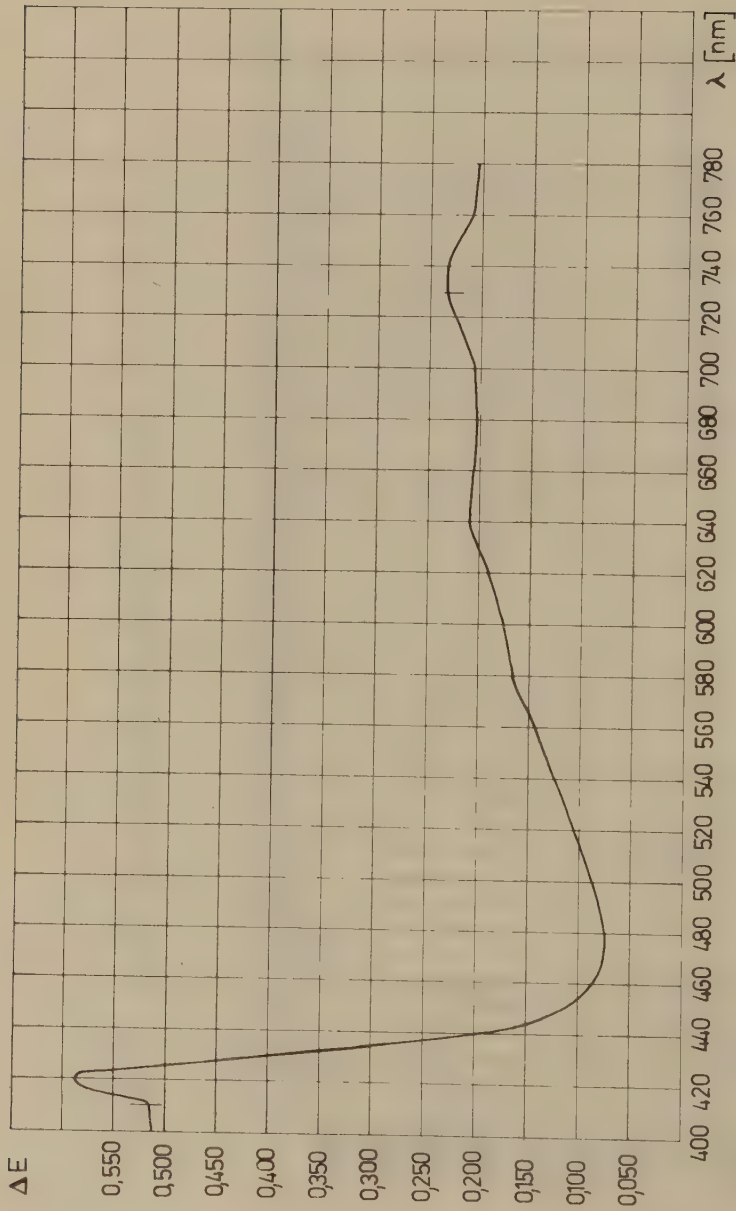


Abb. 2: Abhängigkeit von ΔE (Analyse-Leerwert) von der Wellenlänge

Aus Abb. 2 wird ersichtlich, daß ΔE bei 420 und 730 nm ein Maximum hat ($\Delta E = 0,538$ bzw. $0,233$).

In Zukunft soll in der Nähe desjenigen Maximums gemessen werden, das die größte Empfindlichkeit hat (420 nm).

Da in sehr vielen Labors ein Filterphotometer vorhanden ist, wurde eine Messung bei den dort möglichen Wellenlängen empfohlen.

In Frage kommen für das Eppendorff-Photometer die Hg-Linien 434 und 405 nm.

Da ΔE bei 434 nm stark abfällt (s. Abb. 2), wurden die folgenden Versuche zur Bestimmung der optimalen ABTS-Konzentration bei 405 nm gemessen.

2) Optimale ABTS-Konzentration bei 405 nm

Bei der im vorigen Versuch festgelegten Wellenlänge (405 nm) wurden verschiedene ABTS-Konzentrationen über 15' gemessen.

Die ABTS-Konzentration ist dann optimal, wenn

- a) das oxidierte ABTS über längere Zeit stabil ist und
- b) nach möglichst kurzer Zeit die Endextinktion erreicht ist.

Getestet wurden ABTS-Lösungen mit 1/2-, 2-, 4-, 20-, 40- und 80-facher Konzentration gegenüber $5 \cdot 10^{-4} M$ ABTS (= Konzentration im vorigen Versuch).

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

2 ml PO_{II} -Lsg. (10 μg Meer.- PO_{II} /ml Phosphatpuffer
pH 7,0)

0,2 ml ABTS (Konzentrationen s.o.) in Phosphatpuffer
pH 7,0

0,2 ml $2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

2 ml PO_{II} -Lsg. (10 μg Meer.- PO_{II} /ml Phosphatpuffer
pH 7,0)

0,2 ml ABTS (Konzentrationen s.o.) in Phosphatpuffer
pH 7,0

0,2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

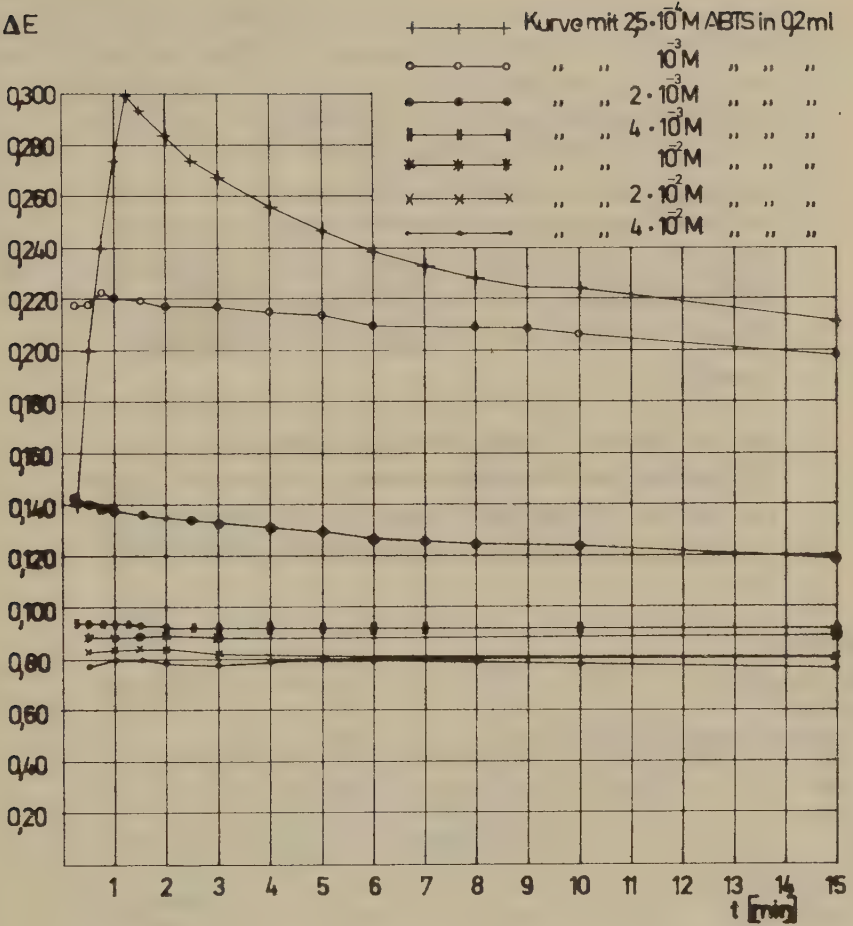
ΔE 

Abb. 3: Zeitlicher Verlauf einiger Kurven mit verschiedenen
 ===== ABTS-Konzentrationen (vgl. Text).

Nach der Abb. 3 ergab sich bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS (entsprechend dem 40-fachen der Konzentration im vorigen Versuch) eine ausreichende Stabilität des dehydrogenierten ABTS über 15' und ein Anstieg auf die Endextinktion in kurzer Zeit.

Gegenüber kleineren ABTS-Konzentrationen hat $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS zwar eine geringere Empfindlichkeit (kleinere Extinktion), aber gleichzeitig den Vorteil einer grösseren Genauigkeit, der uns vorrangig erschien.

Für die folgenden Versuche wurde darum $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS verwandt.

Die für diesen Versuch gemessenen Leerwerte (vgl. Tab. 1) blieben über 15' nahezu konstant.

Das ABTS unterliegt also keiner Autoxidation und keinen Sekundärreaktionen (vgl. Einleitung Punkt I und II).

ABTS-Konz. Mol/l in 0,2 ml	$2,5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
15"	0,065	0,063	0,060	0,103	0,140	0,169	0,325
30"	"	"	"	"	"	"	"
45"	"	"	"	"	"	"	"
1'	"	"	"	0,102	"	0,168	0,322
1' 15"	"	"	"	0,101	0,140	"	"
1' 30"	"	"	"	"	"	"	"
2'	"	"	0,059	"	0,139	"	0,322
2' 30"	"	"	0,058	"	"	"	"
3'	"	0,061	"	"	"	"	"
4'	"	0,060	"	"	"	"	0,320
5'	"	0,059	0,057	"	0,138	"	0,319
6'	0,054	0,058	"	0,100	"	0,167	"
7'	"	"	"	"	"	"	"

(Fortsetzung der Vorseite)

ABTS-Konz. Mol/l in 0,2 ml	$2,5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$
8'	0,054	0,058	0,057	0,100	0,138	0,167	0,317
10'	"	"	0,056	"	0,137	"	"
15'	"	0,056	"	"	0,136	"	"

Tab. 1: Zeitlicher Verlauf einiger Leerwerte mit verschiedenen ABTS-Konzentrationen. Die ABTS-Konzentrationen in der Küvette (2,4 ml) sind um den Faktor 12 kleiner.

3) Haltbarkeit der $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS-Lsg.

Eine $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS-Lsg. wird sofort nach der Herstellung und nach 24 h unter denselben Bedingungen ($T = 25^{\circ} \text{C}$; $\lambda = 405 \text{ nm}$; $\text{pH} = 7,0$) gemessen.

Ablesung der Extinktion nach 4'.

ANSATZ

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_I/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml $2 \cdot 10^{-5}$ M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_I/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

t_0 = Zeit sofort nach Herstellung der ABTS-Lsg.

Zeit	t_0	nach 24 h
Analyse (Mittelwert)	0,715	0,721
Leerwert (Mittelwert)	0,119	0,110
ΔE	0,596	0,611

Tab. 2: Haltbarkeit einer $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS-Lsg. über 24 h.
=====

d.h.: die ABTS-Lsg. ist über 24 h haltbar.

4) Endgültige Durchführung der H_2O_2 -Bestimmung

a) Konzentration der Reagenzien:

PO: Eine Enzymmenge von 10 μ g PO/ml (in 0,2 ml) erwies sich als ausreichend, da praktisch sofort ein vollständiger Umsatz erreicht wurde.

ABTS: Die empfohlene ABTS-Konzentration beträgt $2 \cdot 10^{-2}$ M (in 0,2 ml).

β) Aufbewahrung der Lösungen:

PO: Für die PO-Lsg. gilt, daß sie über 8 h aufbewahrt werden kann (vgl. II. Teil der Arbeit); sie ist aber nicht limitierend, da sie im Überschuß zugegeben wird.

H_2O_2 : Die 10^{-2} M H_2O_2 -Lsg. sollte nach ca. 1 d frisch titriert werden (vgl. II. Teil der Arbeit).

ABTS: Die ABTS-Lsg. ist mindestens über den gleichen Zeitraum haltbar.

3) Sonstige Bedingungen:

Wellenlänge: Das H_2O_2 sollte bei 405 nm bestimmt werden.

pH-Wert: Die Bestimmung könnte theoretisch bei jedem pH vorgenommen werden, bei dem die PO noch aktiv ist. Hier wurde pH 7,0 gewählt, da praktisch meistens in neutralem Milieu gemessen wird.

5) Vorgehen im Einzelnen:

Folgende Reagenzien werden in der nachstehenden Reihenfolge zugegeben:

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. (10 μg PO_I /ml Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

0,2 ml PO_I -Lsg. (10 μg PO_I /ml Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml Phosphatpuffer pH 7,0.

Bei Raumtemperatur ist die Reaktion nach 6' beendet.

b) H_2O_2 -Eichkurve bei pH 7,0 und Bestimmung desEichfaktors

Mit einem Überschuß an PO wurde der Gesamtumsatz bei der jeweiligen H_2O_2 -Konz. gemessen. Zu jeder H_2O_2 -Konz. gehören 4 Messungen.

Der Leerwert wurde einmalig errechnet als Mittelwert aus 8 Messungen. Die Angabe " H_2O_2 -Konz.

[Mol/l] " bezieht sich auf die H_2O_2 -Konz. in 2 ml vor Zugabe der PO- und ABTS-Lösungen.

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

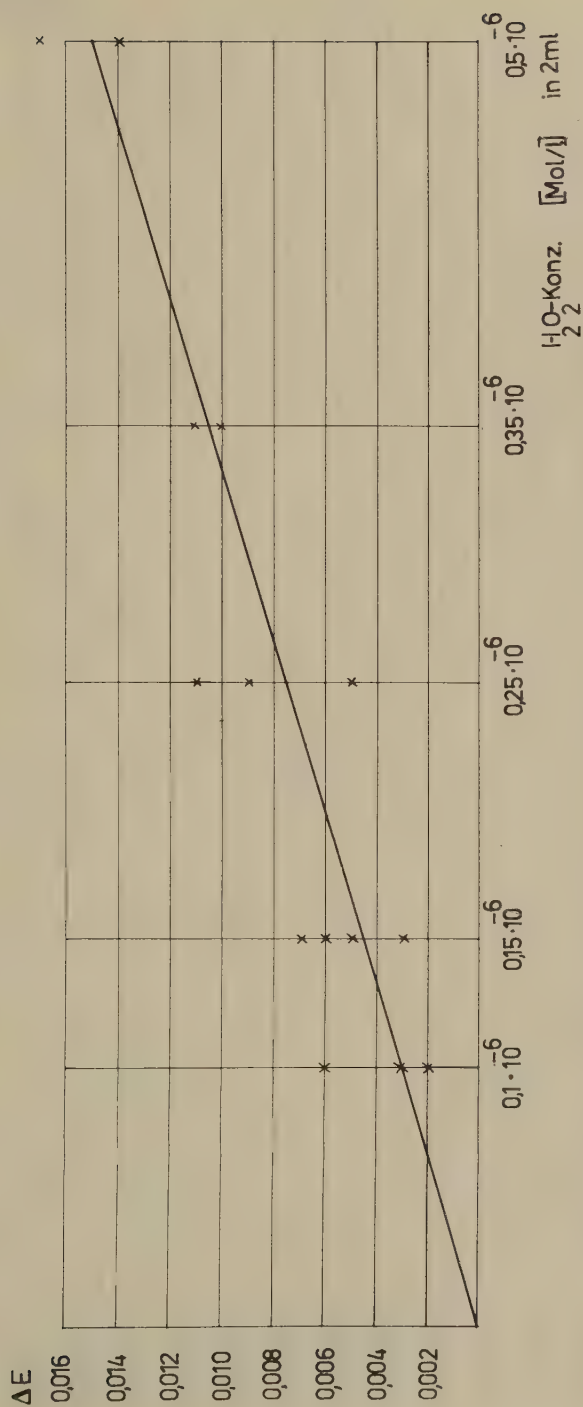
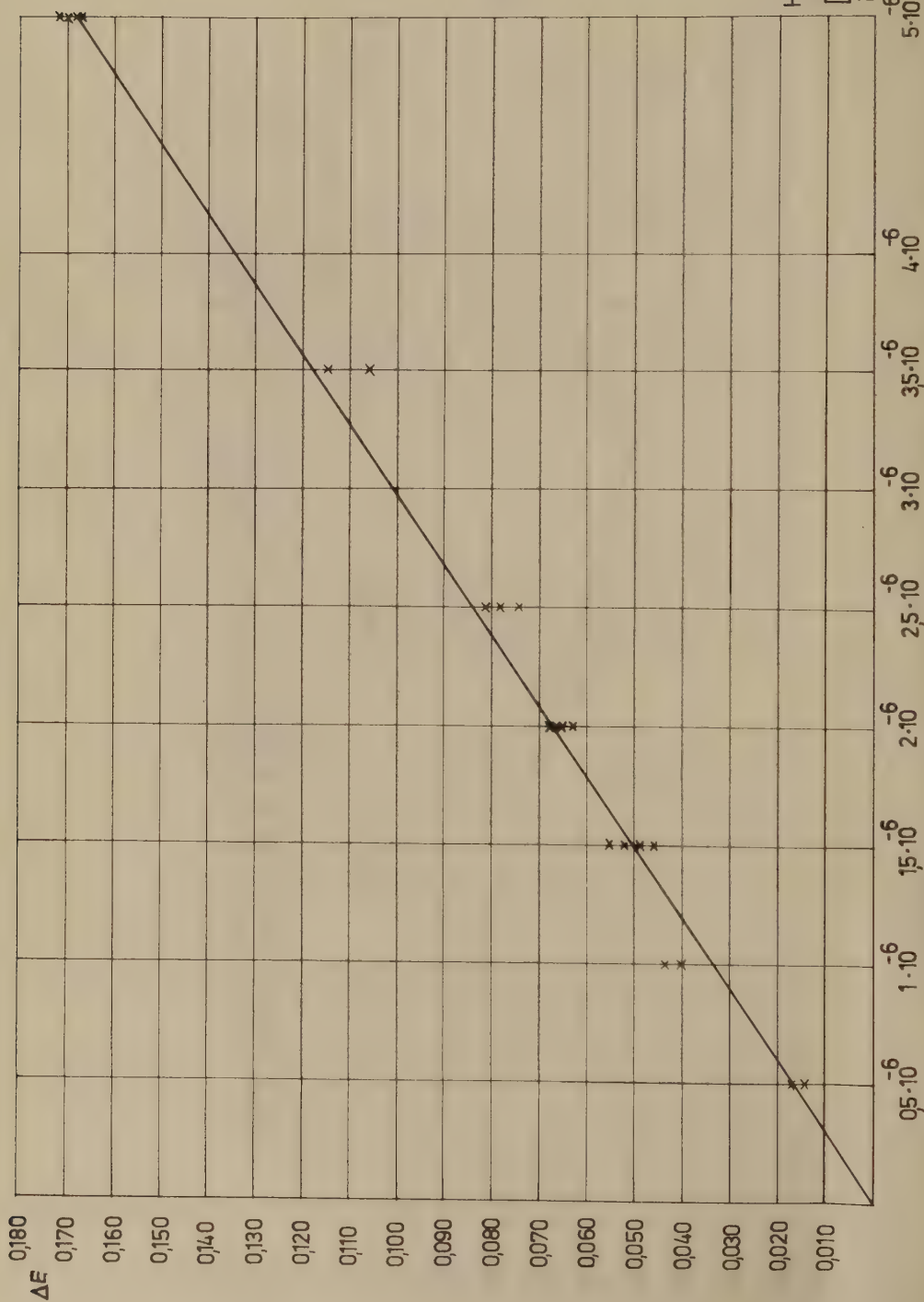


Abb. 4: H_2O_2 -Eichkurve bei pH 7,0; I. Teil
 ===== für den Bereich der H_2O_2 -Konzentration von $0-0,5 \cdot 10^{-6}$ Mol/l (in 2 ml)

Abb. 5: H_2O_2 -Eichkurve bei pH 7,0; II. Teil

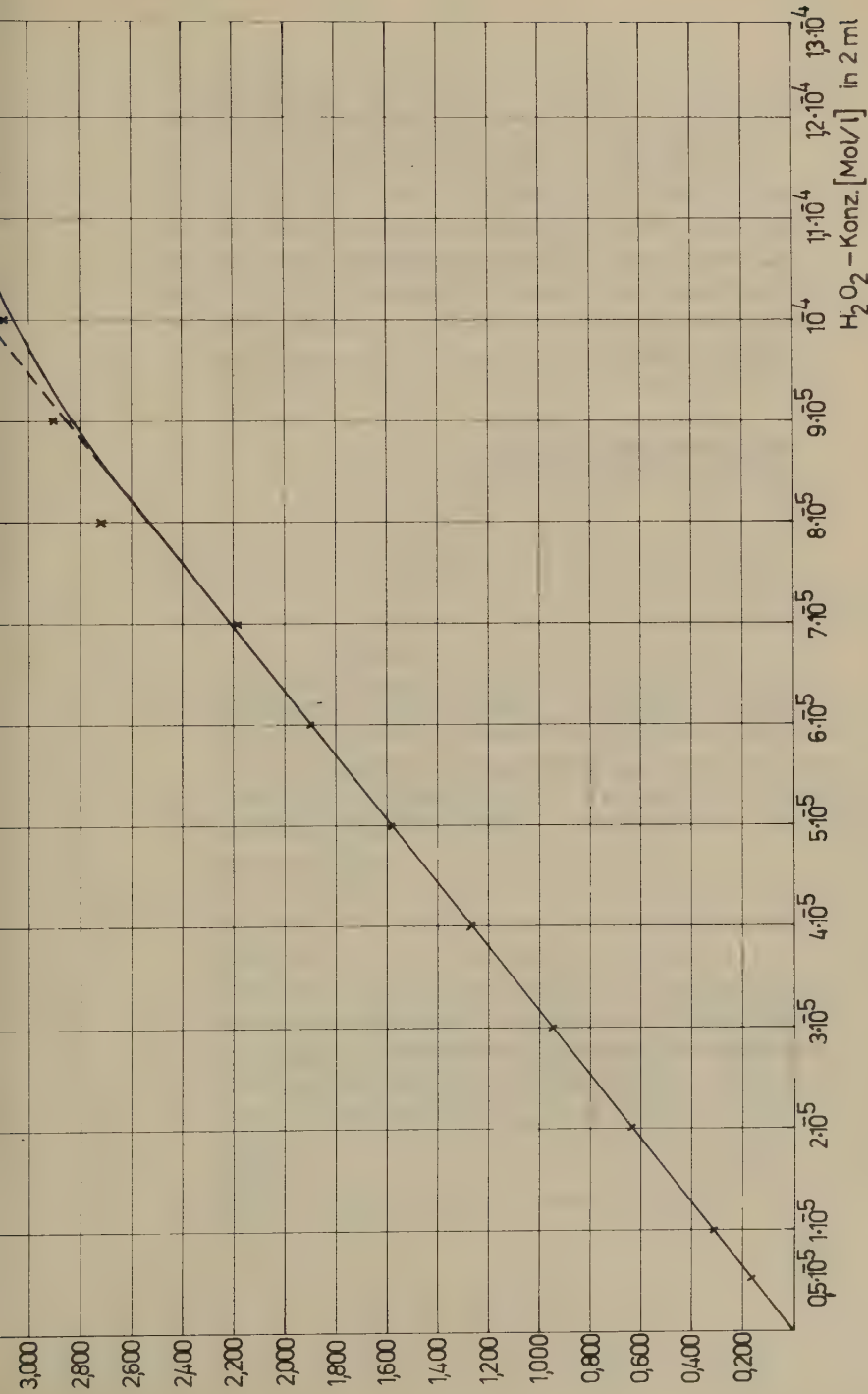


Abb. 6: H_2O_2 -Eichkurve bei pH 7,0; III. Teil
 für den Bereich der H_2O_2 -Konzentration von $0-1,3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l (in 2 ml)
 (siehe auch Abb. 4 u. 5 und Tab. 4).

Aus den Abb. 4-6 wird ersichtlich, daß die H_2O_2 -Eichkurve durch den Nullpunkt geht und bis $8 \cdot 10^{-5}$ M H_2O_2 (in 2 ml) geradlinig verläuft. Oberhalb dieses Wertes ist der Verlauf nicht mehr geradlinig. Die Eichkurve erfüllt für den angegebenen Bereich, also über mehr als 2 Zehnerpotenzen, das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen, daß auch in kleinen Konzentrationsbereichen dieselbe Proportionalität gilt.

BERECHNUNG DES EICHFAKTORS:

Bezogen auf Konzentration (vor Zugabe der Reagenzien):

$$10^{-5} \text{ Mol } \text{H}_2\text{O}_2 / \text{l} \rightarrow \Delta E = 0,310$$

Bezogen auf Menge (in dem vorgeschriebenen Ansatz):

$$10^{-8} \text{ Mol } \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \Delta E = 0,155$$

(theoretisch; Verlängerung des Proportionalitätsbereiches).

$$1 \mu\text{Mol } \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \Delta E = 15,5$$

c) Empfindlichkeit der Bestimmung des H_2O_2

Die Empfindlichkeit der H_2O_2 -Bestimmung wird definiert als Quotient aus Extinktionsdifferenz und H_2O_2 -Konzentration:

$$\text{Empfindlichkeit} = \frac{\Delta E}{\text{H}_2\text{O}_2\text{-Konz.}} \quad \left[\frac{\text{ml}}{\mu\text{g}} \right]$$

Umrechnung von Mol/l auf $\mu\text{g/ml}$:

$$1 \text{ Mol H}_2\text{O}_2/\text{l} \hat{=} 34 \text{ g/l} = \frac{34000 \mu\text{g}}{\text{ml}}$$

$10^{-5} \text{ M H}_2\text{O}_2$ entsprechen $\Delta E = 0,310$
(s. H_2O_2 -Eichkurve)

Für die Empfindlichkeit der H_2O_2 -Bestimmung ergibt sich also:

$$\text{Empfindlichkeit} = \frac{0,310}{\frac{10^{-5} \cdot 34000 \mu\text{g}}{\text{ml}}} =$$

$$\underline{\underline{0,912 \text{ pro } \mu\text{g/ml}}}$$

d) Untere Nachweisgrenze von H_2O_2 und relative Standardabweichung von Leerwert und Analyse

Als untere Nachweisgrenze von H_2O_2 bezeichnet man die niedrigste H_2O_2 -Konzentration, bei der sich noch die Analysenwerte (mit minimaler H_2O_2 -Konzentration) signifikant von den Leerwerten (ohne H_2O_2) unterscheiden.

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurden unter den Bedingungen der H_2O_2 -Eichkurve (vgl. Methodik dort) 10 Analysen und 10 Leerwerte gemessen, um dann die Signifikanz des Unterschiedes errechnen zu können. (Zur Methode der Bestimmung der Standardabweichung siehe [39]).

ANSATZ:

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml $10^{-7}\text{M H}_2\text{O}_2$ in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

Nr.	1	2	3	4	5	6
Analyse	0,114	0,111	0,112	0,113	0,112	0,113
Leerwert	0,112	0,113	0,113	0,113	0,115	0,114

Nr.	7	8	9	10
Analyse	0,114	0,111	0,115	0,116
Leerwert	0,113	0,111	0,113	0,109

Tab. 3: Je 10 Messungen mit $10^{-7}\text{M H}_2\text{O}_2$ und ohne
 =====
 H_2O_2 zur Errechnung der Signifikanz des Unterschiedes.

Nach Tab. 3 fand sich bei $10^{-7}\text{M H}_2\text{O}_2$ kein meßbarer Unterschied. Darum wurden erneut 10 Analysen mit $3 \cdot 10^{-7}\text{M H}_2\text{O}_2$ getestet.

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml $3 \cdot 10^{-7} \text{M}$ H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

Nr.	1	2	3	4	5	6
Analyse	0,125	0,125	0,132	0,129	0,132	0,131
Leerw.	0,117	0,117	0,118	0,115	0,117	0,121

Nr.	7	8	9	10
Analyse	0,128	0,128	0,132	0,131
Leerw.	0,119	0,114	0,118	0,116

Tab. 4: Je 10 Messungen mit $3 \cdot 10^{-7} \text{M}$ H_2O_2 und ohne
 ===== H_2O_2 zur Errechnung der Signifikanz des
 Unterschiedes.

Aus Tab. 4 wurde errechnet: $p < 0,001$ (hoch signi-
 fikant)

d.h.: Die untere Nachweisgrenze für H_2O_2 beträgt
 ungefähr

$2 \cdot 10^{-7} \text{Mol/l}$ (in 2 ml) entspricht

$0,0068 \mu\text{g/ml}$ (in 2 ml).

Relative Standardabweichung von 10 Analysen (mit H_2O_2) und 10 Leerwerten (ohne H_2O_2) zu Tab. 4.

<u>ANALYSEN:</u>	<u>LEERWERTE:</u>
(vgl. Tab. 4)	(vgl. Tab. 4)
Mittelwert: ($\bar{E}$) 0,129	Mittelwert: ($\bar{E}$) 0,117
Relative Standardabweichung: 2,3 %	Relative Standardabweichung: 1,7 %

e) Präzision der Bestimmung des H_2O_2

Zur Ermittlung der Präzision der H_2O_2 -Bestimmung errechneten wir die relative Standardabweichung von 10 Werten in einem günstigen Meßbereich. $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ H_2O_2 erschien geeignet (vgl. Abb 6) und wurde darum in einem Ansatz von 10 Analysen getestet. Dabei fanden dieselben Reagenzien wie bei der H_2O_2 -Eichkurve Anwendung, und auch die übrigen Versuchsbedingungen waren wie dort.

ANSATZ:
=====

ANALYSE:

0,2 ml PO_{II} -Lsg. (10 μg PO_{II} /ml Phosphatpuffer
pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml $2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

0,2ml PO_{II} -Lsg. (10 μg PO_{II} /ml Phosphatpuffer
pH 7,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0
 2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

Nr.	1	2	3	4	5
ΔE (Analyse -Leerwert)	0,587	0,589	0,593	0,587	0,586

Nr.	6	7	8	9	10
ΔE (Analyse -Leerwert)	0,593	0,588	0,586	0,588	0,590

Tab. 5: Relative Standardabweichung von 10 Messungen mit $2 \cdot 10^{-5}$ M H_2O_2 zur Errechnung der Präzision der H_2O_2 -Bestimmung.

Aus Tab. 5 errechnete sich ein Mittelwert von 0,589.

Die relative Standardabweichung war 0,5 %.

II. Bestimmung der Peroxidase

Wie bei dem Abschnit D. I., der " H_2O_2 -Bestimmung", so soll auch am Beginn des Abschnittes D. II., der "Peroxidase-Bestimmung" ein kurzer Überblick über dieses Kapitel gegeben werden.

Zunächst wurde die Haltbarkeit von reinen Meerrettich- und Lacto-PO Lösungen getestet [a)].

Der folgende Punkt: "Suche nach der optimalen H_2O_2 -Konzentration und deren Festlegung" [b)] gilt als Vorversuch zu den eigentlichen K_M -Bestimmungen, die später folgen.

Nach Festlegung der zu empfehlenden H_2O_2 -Konzentration wurde diese auf ihre Stabilität hin geprüft [c)].

Danach folgt die Ermittlung der Michaelis-Konstanten für ABTS und H_2O_2 , und zwar für jede Bestimmung bei jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen des jeweils anderen Substrats [a] .

Als letzte Bedingung zur PO-Bestimmung wurde die PO-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten getestet [e] .

Der Punkt: "Endgültig vorgeschlagene Methode zur Bestimmung der PO-Aktivität" [f] gibt eine Zusammenfassung der erarbeiteten Methode zu PO-Bestimmung .

Es folgen die Eichkurven der Meerrettich- und Lacto-Peroxidasen [g] .

Beendet wird der Abschnitt durch die Festlegung der analytischen Parameter "Empfindlichkeit der PO-Bestimmung" [h] , "untere Nachweisgrenze von PO_I und Standardabweichung" [i] und "Präzision der Meerrettich- PO_I -Bestimmung" [j] .

a) Haltbarkeit von reinen Meerrettich- bzw. Lacto- PO-Lösungen

Es soll getestet werden, wie groß die Aktivitätsabnahme von reinen Meerrettich- bzw. Lacto-PO Lösungen nach bestimmten Zeitabständen ist, um eine Empfehlung zur PO-Aufbewahrung geben zu können.

Dazu wurde von einer PO-Stammlösung ($0,1 \mu g/ml$) jeweils $0,2 ml$ für Messungen nach bestimmten Zeitabständen verwandt.

1) Meerrettich- PO_{II} ANALYSENANSATZ:

0,2 ml PO_{II} -Lsg. ($0,1 \mu\text{g PO}_{\text{II}}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml 10^{-2}M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

Die PO -Stamm- α) eingefroren und aufgetaut
lösung wurde: (vgl. Tab. 6)

β) im Kühlschrank aufbewahrt
(vgl. Tab. 7)

γ) bei Zimmertemp. aufbewahrt
(vgl. Tab. 8)

Zeit	t_0	nach dem Einfrieren und Auftauen
Aktivitätsabnahme %	0	32,5

Tab. 6: Aktivitätsabnahme der PO_{II} nach dem Einfrieren und Auftauen.

Zeit	t_0	nach 1d	nach 7d	nach 12d
Aktivitätsabnahme %	0	10	35	60

Tab. 7: Aktivitätsabnahme der PO_{II} bei Aufbewahrung
im Kühlschrank.

Zeit	t_0	nach 1d	nach 7d	nach 12d
Aktivitätsabnahme %	0	7,5	32,5	50

Tab. 8: Aktivitätsabnahme der PO_{II} bei Aufbewahrung
bei Zimmertemperatur.

Aus den Tabellen 6-8 wird ersichtlich, daß die Meer.-PO_{II} Lsg. im Kühlschrank nicht haltbarer ist als bei Zimmertemperatur; auch nach dem Einfrieren ist sie nicht stabiler.

Sie kann also bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, jedoch nicht länger als ein Arbeitstag (ca. 8 h).

2) Lacto-PO

ANALYSENANSATZ:

0,2 ml Lacto-PO (0,1 µg Lacto-PO/ml Phosphatpuffer pH 7,0)

2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml 10^{-2} M H₂O₂ in Phosphatpuffer pH 7,0

Die Lacto-PO Stammlösung wird bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Zeit	t ₀	nach 1h	nach 2h	nach 3h	nach 4h
Aktivitätsabnahme %	0	32	38	40	60

Tab. 9: Aktivitätsabnahme der Lacto-PO[%] bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.

Aus Tab. 9 wird ersichtlich, daß die Aktivitätsabnahme der Lacto-PO sehr stark ist. Die Lacto-PO Lsg. sollte nicht länger als 1/2 h aufbewahrt werden.

b) Optimale H₂O₂-Konzentration

Vor den K_M-Bestimmungen, die später vorgenommen werden, ist die Frage zu klären, ob die Enzymaktivität

auch ohne Substratabnahme sich ändert. Es bestünde die Möglichkeit, daß die PO durch H_2O_2 inaktiviert wird, und zwar bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen verschieden stark. Falls das zutrifft, soll diejenige H_2O_2 -Konzentration herausgefunden werden, die die PO-Aktivität wenig hemmt, aber noch hinreichende Genauigkeit ergibt.

1) Meerrettich-Peroxidase

Um die Inaktivierung der Meer.-PO_{II} durch H_2O_2 zu testen, wurden 3 Ansätze mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen über 30' gemessen. Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit x der Meer.-PO_{II} von 20'-30' gegenüber der Reaktionsgeschwindigkeit von 0-10' in % errechnete sich nach der Formel:

$$x [\%] = 100 - \left(\frac{\Delta E \text{ von } 20'-30'}{E \text{ von } 0-10'} \cdot 100 \right)$$

Die beiden Ansätze mit 10^{-2} und 10^{-3} M H_2O_2 (jeweils in 0,2 ml) erhielten 0,05 μg PO_{II}/ml, der Ansatz mit 10^{-4} M H_2O_2 wurde mit 0,1 μg PO_{II}/ml versehen.

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

0,2 ml H_2O_2 (10^{-2} , 10^{-3} u. 10^{-4} M) in Phosphatpuffer
pH 7,0

2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml PO_{II} (0,05 bzw. 0,1 μg /ml Phosphatpuffer
pH 7,0)

LEERWERT:

0,2 ml H_2O_2 (10^{-2} , 10^{-3} u. 10^{-4}M) in Phosphatpuffer
pH 7,0)

2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

t (sec)	Ansatz mit ...		
	$10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$	$10^{-3}\text{M H}_2\text{O}_2$	$10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$
	$\Delta E =$	$\Delta E =$	$\Delta E =$
0	0	0	0
10	0,152	0,093	0,062
20	0,298	0,176	0,102
30	0,422	0,249	0,133

Tab.10: Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit der
===== PO_{II} in 3 verschiedenen Ansätzen mit unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen. Die H_2O_2 -Konzentrationen beziehen sich auf die Molarität der H_2O_2 -Lsg. vor Zugabe der übrigen Reagenzien. Berechnung der Aktivitätsabnahme nach Formel s.o.

Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 20' und 30' betrug bei einem Ansatz mit:

$$\underline{10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2 \quad x = 18,4 \%}$$

$$\underline{10^{-3}\text{M H}_2\text{O}_2 \quad x = 21,5 \%}$$

$$\underline{10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2 \quad x = 50,0 \%}$$

(Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die

H_2O_2 -Konzentration in 0,2 ml).

Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit in 20' kann bei dem Ansatz mit 10^{-2} und 10^{-3}M H_2O_2 in der Hauptsache nicht an der Abnahme der Substrate liegen, da die Substratkonzentration für beide Substrate erheblich größer ist als die K_M (vgl. Tab. 16 a) und da nur ein relativ kleiner Anteil des Substrates umgesetzt wird. Dagegen ist die Aktivitätsabnahme des Ansatzes mit 10^{-4}M H_2O_2 in der Hauptsache durch Abnahme der H_2O_2 -Konzentration zu erklären.

Die prozentuale Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ist bei 10^{-2} und 10^{-3}M H_2O_2 praktisch gleich. 10^{-2}M H_2O_2 hat aber den Vorteil, daß bei dieser H_2O_2 -Konzentration 98 % des Enzyms mit Substrat gesättigt sind, während dies bei 10^{-3}M H_2O_2 nur zu 84 % der Fall ist.

Darum soll 10^{-2}M H_2O_2 für die Messungen zur Meer.- PO_{II} -Bestimmung empfohlen werden.

2) Lacto-Peroxidase

Es soll festgestellt werden, bei welcher H_2O_2 -Konzentration die Lacto-PO

- 1) die größte zeitliche Konstanz
(ΔE von 1'-2', ΔE von 2'-3' usw.)
- 2) den größten absoluten Umsatz
(ΔE in 5') hat.

Dazu wurden 4 Ansätze mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen über 5' gemessen:

ANALYSENANATZ:

2 ml Lacto-PO Lsg. ($0,04 \mu\text{g}$ Lacto-PO/ml Phosphatpuffer pH 6,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

(Konzentration siehe Tab. 11)

	$0,25 \cdot 10^{-3}$ M H_2O_2	ΔE von 1'-2'; 2'-3' usw.	10^{-3} M H_2O_2	ΔE von 1'-2'; 2'-3' usw.	$5 \cdot 10^{-3}$ M H_2O_2	ΔE von 1'-2'; 2'-3' usw.	10^{-2} M H_2O_2	ΔE von 1'-2'; 2'-3' usw.
Analyse nach 1'								
2'	0,158	0,005	0,169	0,015	0,182	0,019	0,189	0,014
3'	0,163	0,005	0,184	0,014	0,201	0,014	0,203	0,012
4'	0,168	0,006	0,198	0,013	0,215	0,013	0,215	0,009
5'	0,174	0,007	0,211	0,012	0,228	0,011	0,224	0,008
6'	0,181	0,005	0,223	0,011	0,239	0,012	0,232	0,006
	0,186		0,234		0,251		0,238	
ΔE in 5'	0,028		0,065		0,069		0,049	

Tab. 11: Messungen zur zeitlichen Konstanz und zum absoluten Umsatz der Lacto-P0.
 Die H_2O_2 -Konzentrationen beziehen sich auf die Molarität der H_2O_2 -Lsg.
 in 0,2 ml.

Aus Tab. 11 geht hervor, daß bei $0,25 \cdot 10^{-3} \text{ M H}_2\text{O}_2$ (in 0,2 ml) die Lacto-PO die größte zeitliche Konstanz hat. (ΔE von 1'-2', 2'-3', 3'-4' usw. bleiben annähernd gleich).

Bei $5 \cdot 10^{-3} \text{ M H}_2\text{O}_2$ (in 0,2 ml) hat die Lacto-PO die größte absolute Aktivität (ΔE in 5'). Die Aktivität der Lacto-PO wird abhängig von der H_2O_2 -Konzentration inaktiviert.

Obwohl $10^{-2} \text{ M H}_2\text{O}_2$ (in 0,2 ml) also nicht die für die Lacto-PO optimale H_2O_2 -Konzentration ist, soll sie auch für die Lacto-PO empfohlen werden, um eine einheitliche Methode für alle PO-Bestimmungen zu erreichen. Für die spezielle Bestimmung der Lacto-PO wäre 10^{-3} M zu empfehlen, da bei dieser Konzentration die Abnahme noch gering ist und der Gesamtumsatz wesentlich größer ist als bei kleineren H_2O_2 -Konzentrationen.

c) Stabilität der $10^{-2} \text{ M H}_2\text{O}_2$ -Lösung

Nachdem in den vorigen beiden Versuchen die H_2O_2 -Konzentration festgelegt worden ist, mit der die PO am günstigsten zu bestimmen ist, soll die empfohlene H_2O_2 -Konzentration auf ihre Stabilität hin geprüft werden.

Dazu benötigte man eine $0,01 \text{ M H}_2\text{O}_2$ -Stammlösung, von der jeweils 50 ml nach bestimmten Zeitabständen entnommen und anschließend gegen KMnO_4 titriert wurden (50 ml für große Meßgenauigkeit; das KMnO_4 wurde zuvor mit Oxalsäure titriert). Danach erfolgte die Berechnung der Konzentrationsabnahme in % gegenüber der Konzentration bei t_0 .

t_0 = Zeit 10' nach Herstellung der H_2O_2 -Lsg.

Zeit	t_0	nach 6h	nach 1d	nach 2d	nach 3d	nach 4d
M H_2O_2	0,01	0,0099	0,0099	0,0099	0,0099	0,0099
Konzentrationsabnahme [%] gegen- über der Konz. bei t_0 .	0	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

Tab. 12: Stabilität der 10^{-2} -M H_2O_2 -Lsg.
=====

Aus Tab. 12 wird ersichtlich, daß die 10^{-2} -M H_2O_2 -Konzentration in 4 Tagen nicht abgenommen hat.

Obwohl also ein Konzentrationsverlust innerhalb
weniger Tage nicht zu befürchten ist, sollte die
 10^{-2} -M H_2O_2 -Lsg. jeden Tag frisch angesetzt bzw.
titriert werden, um der Gefahr einer Infektion
zu entgehen.

d) Bestimmung der Aktivität der Meerrettich-Peroxi-
dase_{II} bei verschiedenen Substratkonzentrationen

Der folgende Versuch dient der Messung der Aktivität der PO_{II} bei verschiedenen Konzentrationen des jeweils anderen Substrates.

In einem Vorversuch wurden zunächst Korrekturfaktoren für die Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen ABTS-Konzentrationen, die für die K_M -Bestimmungen genutzt wurden, errechnet [1]).

Die sich daran anschließende eigentliche Bestimmung der Michaelis-Konstanten gliedert sich in 2 Abschnitte:

die Messungen bei pH 7,0 [2)] und
die bei pH 6,0 [3)] .

Die Michaelis-Konstanten bei pH 7,0 für ABTS und H_2O_2 wurden bei jeweils 2 verschiedenen Konzentrationen des anderen Substrates bestimmt [2) d) - e)], während die K_M -Versuche bei pH 6,0 für ABTS und H_2O_2 nur bei einer Substratkonzentration, und zwar bei der später vorgesehenen, gemessen wurden.

Der Übersicht dient eine Zusammenfassung am Ende des 2. Abschnittes [2) e)] .

Die Michaelis-Konstanten der Lacto-PO wurden nicht bestimmt, da die Aktivität der Lacto-PO zu schnell abfiel (vgl. Tab. 11).

Bei der BESTIMMUNG DER MICHAELIS-KONSTANTEN der

Meer.- PO_{II} wandten wir FOLGENDE METHODE an:

Für jede Substratkonzentration wurde ein Analysenansatz nach 1' und 11' abgelesen, d.h. die Messung erfolgte über eine konstante Zeit. Aus ΔE in 10' wurde ΔE in 1' errechnet, danach durch Division durch den Eichfaktor die Substratumsatzgeschwindigkeit bestimmt.

WAHL DER VOLUMINA FÜR DIE REAGENZIEN in den einzelnen Versuchen:

Bei den verschiedenen Versuchen wurde das größte

Volumen jeweils für das Substrat genommen, für das die K_M zu bestimmen war.

Beispiel: Bestimmung der K_M 0,2 ml PO-Lsg.
 für ABTS: 2,0 ml ABTS-Lsg.
 0,2 ml H_2O_2 -Lsg.

Eine Ausnahme bilden die Versuche der Bestimmungen der Michaelis-Konstanten für H_2O_2 (Begründung s. dort).

1) Vorversuch: Bestimmung der Extinktion für vollständigen Umsatz bei verschiedenen ABTS-Konzentrationen mit $10^{-4}M H_2O_2$

Es hat sich vorher (vgl. Abb. 3) schon herausgestellt, daß das Differenzspektrum ΔE (Analyse-Leerwert) abhängig ist von der ABTS-Konzentration.

Diese Beziehung soll nun quantitativ untersucht werden, indem die Extinktion für vollständigen Umsatz bei verschiedenen ABTS-Konzentrationen mit $10^{-4}M H_2O_2$ zu ermitteln ist.

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

0,2 ml Meer.- PO_{II} Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_{\text{II}}/\text{ml}$ Phosphatpuffer pH 7,0)

2 ml ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml $10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$ in Phosphatpuffer pH 7,0

LEERWERT:

2 ml Phosphatpuffer pH 7,0

2 ml ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml $10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$ in Phosphatpuffer pH 7,0

ABTS-Konz. [Mol/l] in 2 ml	10^{-3}	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,33 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-3}$
ΔE	0,350	0,340	0,328	0,325	0,302

ABTS-Konz. [Mol/l] in 2 ml	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2}$
ΔE	0,295	0,286	0,272	0,261

Tab. 13: Vollständiger Umsatz bei verschiedenen ABTS-Konzentrationen mit $10^{-4}\text{M H}_2\text{O}_2$ (in 0,2 ml). Vgl. dazu Abb. 7. Die Angabe "ABTS-Konz. Mol/l " bezieht sich auf die Molarität der ABTS-Lsg. vor Zugabe der übrigen Reagenzien.

Die Korrekturfaktoren für die Bestimmung von v ergaben sich folgendermaßen:

Aus den Werten in Tab. 13 wurde die Abb. 7 gezeichnet. ΔE bei $2 \cdot 10^{-3} \text{ M ABTS}$ ($= 0,325$) diene als Bezugswert.

$0,325 : \Delta E$ für jede ABTS-Konz. (aus Abb. 7 entnommen) ergab den entsprechenden Korrekturfaktor.

ABTS-Konz. [Mol/l] in 2ml	Korrekturfaktor
10^{-3}	0,964
$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,969
$1,33 \cdot 10^{-3}$	0,979
$2 \cdot 10^{-3}$	1
$3,3 \cdot 10^{-3}$	1,032
$4 \cdot 10^{-3}$	1,042
$5 \cdot 10^{-3}$	1,054
10^{-2}	1,102
$2 \cdot 10^{-2}$	1,150
$3 \cdot 10^{-2}$	1,181
$4 \cdot 10^{-2}$	1,204
$6 \cdot 10^{-2}$	1,233

Tab. 14: Korrekturfaktoren für v bei verschiedenen
===== ABTS-Konzentrationen. Herleitung s. Text.

Bei semilogarithmischer Auftragung der Extinktion gegen die ABTS-Konzentration ergibt sich ungefähr

eine Gerade, wie Abb. 7 zeigt. Mit Hilfe der Geraden in Abb. 7 können ΔE -Werte für beliebige ABTS-Konzentrationen abgelesen werden.

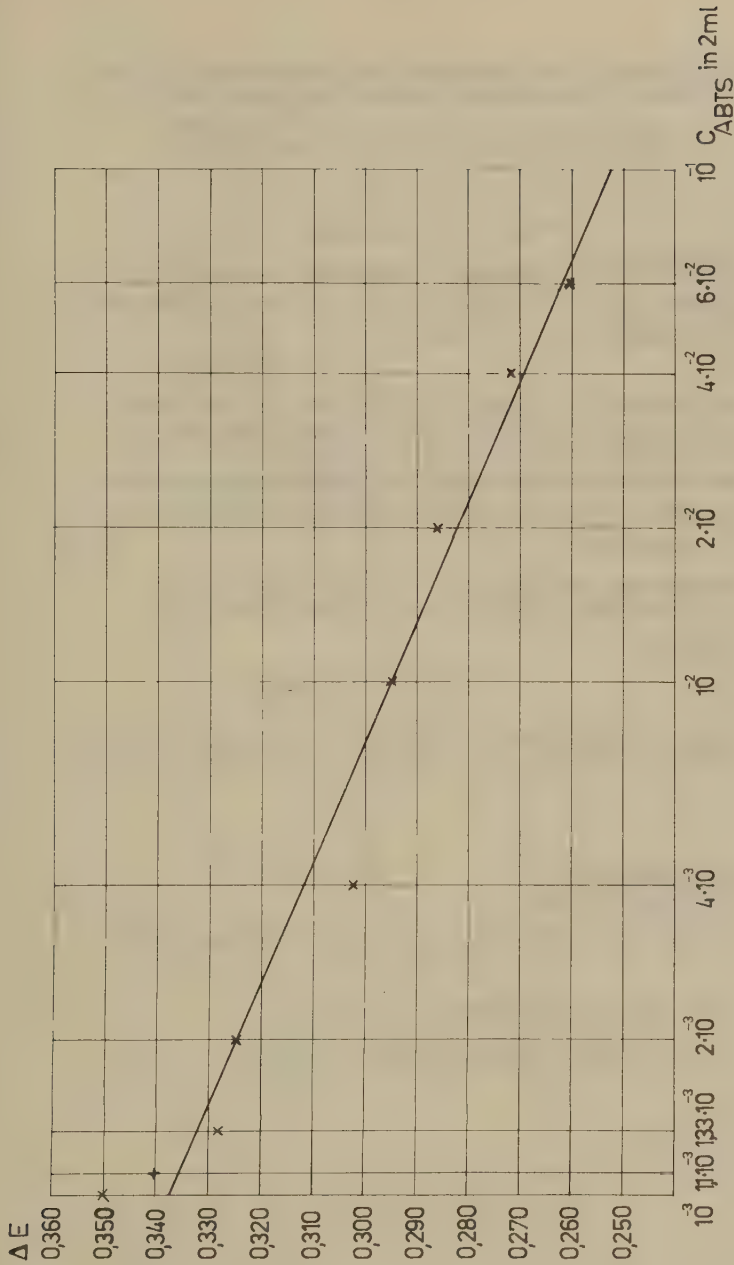


Abb. 7: Extinktion für vollständigen Umsatz bei verschiedenen ABTS-Konzentrationen
 mit $10^{-4}M$ H_2O_2 (siehe dazu die Tabelle 13).

2) Bestimmung der Michaelis-Konstanten bei pH 7,0

a) K_M der PO_{II} für ABTS mit $10^{-3}M$ H_2O_2 bei
pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für ABTS wurde bestimmt bei Zugabe von 0,2 ml $10^{-3}M$ H_2O_2 , d.h. für eine Endkonzentration von $8,33 \cdot 10^{-5} \text{ Mol } H_2O_2/l$.

Bei dieser Bestimmung fertigten wir 2 verschiedene Meßreihen an, die in Abb. 8 gezeichnet wurden. Aus den beiden sich für die 2 Meßreihen ergebenden K_M -Werten errechnete sich dann die endgültige K_M als Mittelwert.

Umrechnung von C_{ABTS} in 2 ml auf C_{ABTS} in der

Küvette:

$$\underline{C_{ABTS} \text{ in der Küvette} = \frac{2}{2,4} (= 0,833) \cdot C_{ABTS} \text{ in 2 ml}}$$

ANALYSENANSATZ:

0,2 ml PO_{II} -Lsg. ($0,1 \mu g PO_{II}/ml$ Phosphatpuffer
pH 7,0)

2 ml ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 $10^{-3}M$ H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

Berechnung des Mittelwertes der Michaelis-
Konstanten

$$K_M \text{ der 1. Meßreihe} = 3,6 \cdot 10^{-3}$$

$$K_M \text{ der 2. Meßreihe} = 3,29 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Mittelwert : } K_M =$$

$$3,4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$$

(vgl. Abb. 8)

Bei einer H_2O_2 -Konzentration von $8,33 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

betrug demnach die K_M für ABTS $3,4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$.

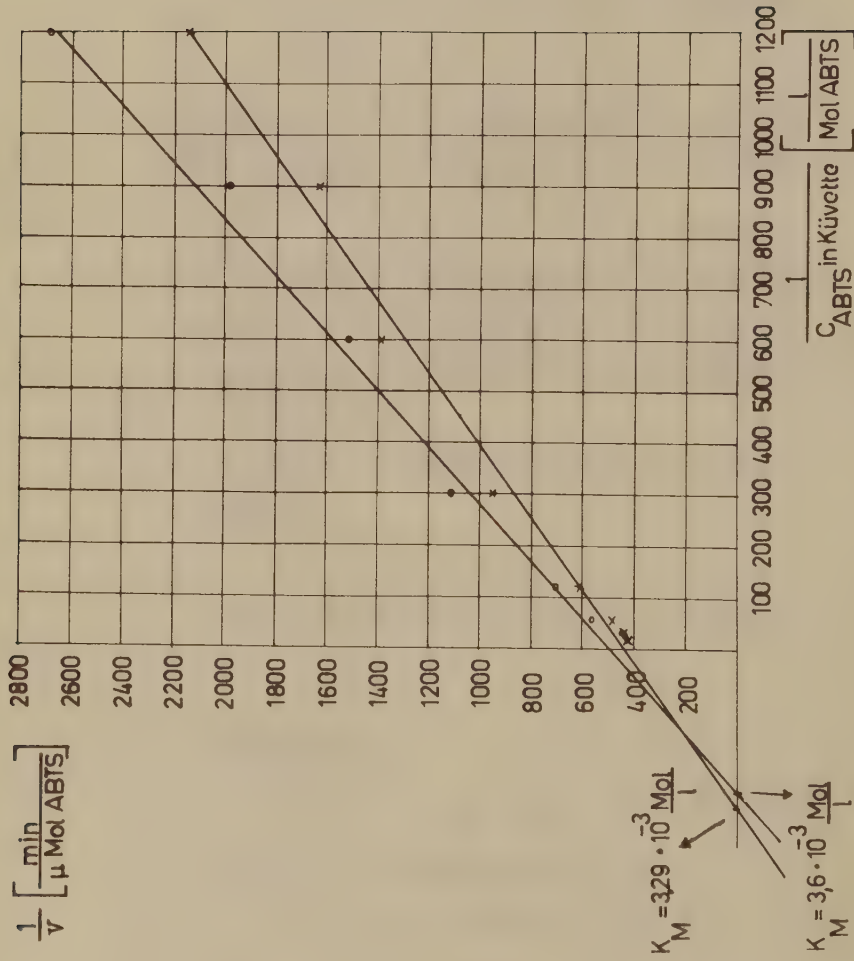


Abb. 8: K_M der Meerrettich-PO-II für ABTS mit 10^{-3} M H_2O_2 bei pH 7,0.
 Die Angabe " 10^{-3} M H_2O_2 " bezieht sich auf die H_2O_2 -Konzentration in 0,2 ml.
 Entsprechend wäre diese in der Küvette $8,3 \cdot 10^{-5}$ M (2 verschiedene Meßreihen).

β) K_M der PO_{II} für ABTS mit $10^{-2}M$ H_2O_2 bei pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für ABTS wurde bestimmt bei Zugabe von 0,2 ml $10^{-2}M$ H_2O_2 , d.h. für eine Endkonzentration von $8,33 \cdot 10^{-4}$ Mol H_2O_2/l .

Umrechnung von C_{ABTS} in 2ml auf C_{ABTS} in Küvette:
Siehe beim vorausgegangen Versuch.

ANALYSENANSATZ:

0,2 ml PO_{II} -Lsg. ($0,1 \mu g$ PO_{II}/ml Phosphatpuffer
pH 7,0)

2 ml ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml $10^{-2}M$ H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0.

Die K_M der PO_{II} für ABTS mit $10^{-2}M$ H_2O_2 bei

pH 7,0 betrug $6,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l (s. dazu Abb. 9).

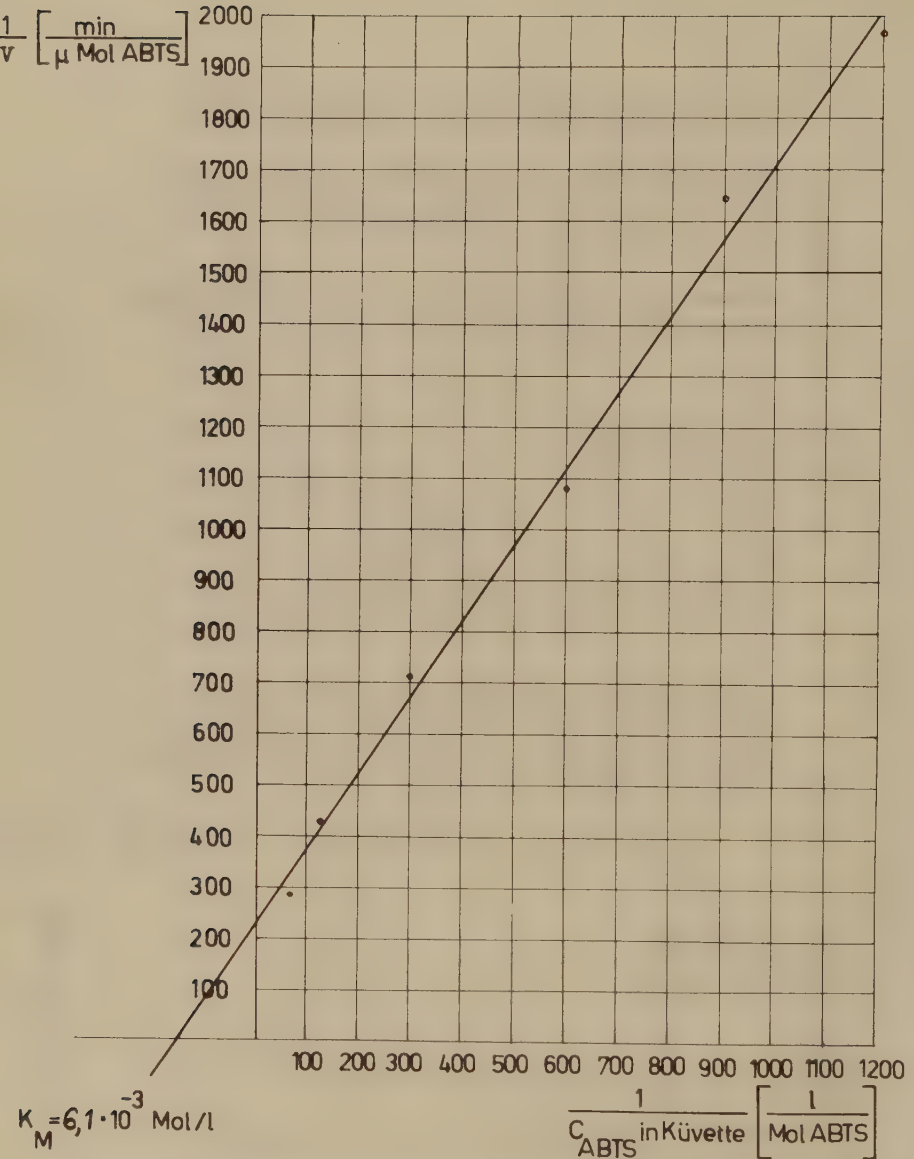


Abb. 9: K_M der Meerrettich-PO für ABTS mit $10^{-2} \text{M H}_2\text{O}_2$ bei pH 7,0. Die Angabe " $10^{-2} \text{M H}_2\text{O}_2$ " bezieht sich auf die H_2O_2 -Konzentration in 0,2 ml. Entsprechend wäre diese in der Küvette $8,33 \cdot 10^{-4} \text{M H}_2\text{O}_2$.

8) K_M der PO_{II} für H_2O_2 mit $4 \cdot 10^{-3} M$ ABTS bei pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für H_2O_2 wurde bestimmt bei Zugabe von 0,2 ml $4 \cdot 10^{-3} M$ ABTS, d.h. für eine Endkonzentration von $3,3 \cdot 10^{-4}$ Mol ABTS/l.

Im Gegensatz zur sonst üblichen Wahl der Volumina bei K_M -Bestimmungen wurde hier nicht für das zu bestimmende Substrat (H_2O_2) das größte Volumen im Ansatz **genommen** (2 ml), sondern nur 0,2 ml. Der Grund dafür war folgender: Bei gleicher H_2O_2 -Endkonzentration in der Küvette müßte die H_2O_2 -Konzentration in 2 ml stärker verdünnt sein als in 0,2 ml. Da eine stärker verdünnte Lsg. aber schneller zerfällt als eine konzentriertere [40] und da dadurch ein Fehler entstehen könnte, wurden 0,2 ml gewählt.

Umrechnung von $C_{H_2O_2}$ in 0.2 ml auf $C_{H_2O_2}$ in der Küvette:

$$C_{H_2O_2} \text{ in } 0.2 \text{ ml} \cdot 0.0833 = C_{H_2O_2} \text{ in der Küvette}$$

ANALYSENANSATZ:

2 ml PO_{II} -Lsg. (0,04 μg PO_{II} / ml Phosphatpuffer pH 7,0)

0,2 ml $4 \cdot 10^{-3} M$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für H_2O_2 mit $4 \cdot 10^{-3} M$ ABTS bei pH 7,0 betrug $6,3 \cdot 10^{-6}$ Mol/l. (vgl. Abb. 10)

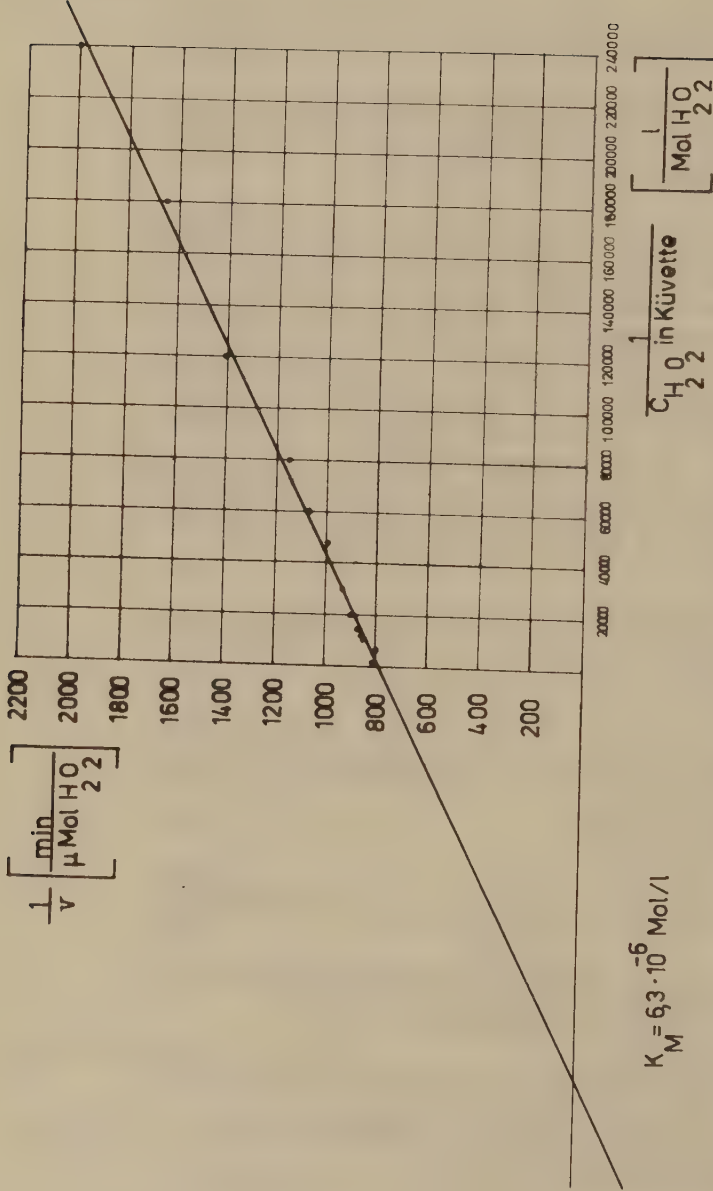


Abb. 10: K_M der Meerrettich- PO_{II} für H_2O_2 mit $4 \cdot 10^{-3} M$ ABTS bei pH 7,0.

Die Angabe " $4 \cdot 10^{-3} M$ ABTS" bezieht sich auf die ABTS-Konzentration in

0,2 ml. Entsprechend wäre diese in der Küvette $3,3 \cdot 10^{-4} M$ ABTS.

d) K_M der PO_{II} für H_2O_2 mit $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS bei pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für H_2O_2 wurde bestimmt bei Zugabe von 0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS, dh. für eine Endkonzentration von $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$.

Die Wahl der Volumen war hier genau wie im vorangegangenen Versuch.

ANALYSENANSATZ:

2 ml PO_{II} -Lsg. ($0,02 \mu g PO_{II} / \text{ml Phosphatpuffer pH 7,0}$)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für H_2O_2 mit $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS betrug

$1,7 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$. (vgl. Abb. 11)

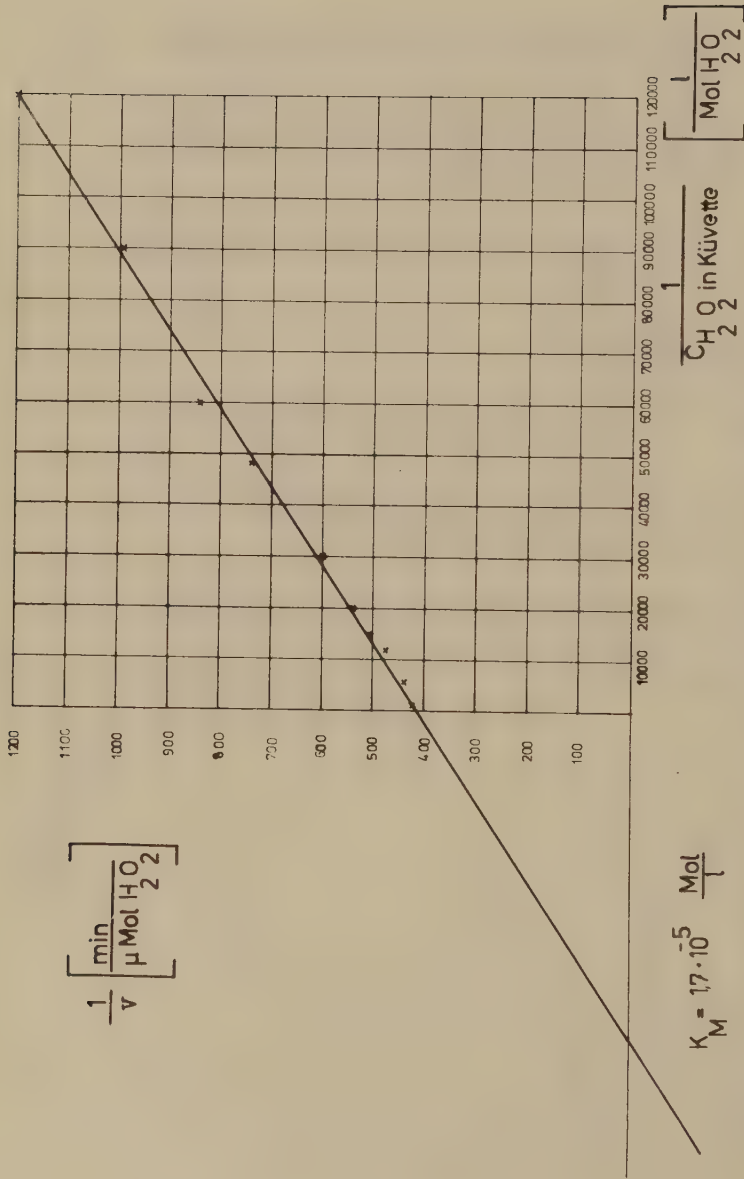


Abb. 11: K_M der Meerrettich- PO_{II} für H_2O_2 mit $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS bei pH 7,0.

Die Angabe " $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS" bezieht sich auf die Konzentration in 0,2 ml.

In der Küvette wäre diese dementsprechend $1,7 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

3. Bestimmung der Michaelis-Konstanten bei pH 6,0

Die Michaelis-Konstanten bei pH 6,0 für ABTS u. H_2O_2 bei pH 6,0 wurden nur mit denjenigen Substratkonzentrationen bestimmt, die sich in den vorausgegangenen Versuchen als am gängigsten erwiesen hatten ($10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$ bzw. $2 \cdot 10^{-2}\text{M ABTS}$).

a) K_M der PO_{II} für ABTS mit $10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$ bei pH 6,0

Die K_M der PO_{II} für ABTS wurde bestimmt bei Zugabe von 0,2 ml $10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$, d.h. für eine Endkonzentration von $8,33 \cdot 10^{-4}\text{ Mol H}_2\text{O}_2/\text{l}$.

ANALYSENANSATZ:

0,2 ml PO_{II} -Lsg. ($0,1\text{ }\mu\text{g PO}_{\text{II}}/\text{ml Phosphatpuffer pH } 7,0$)

2 ml ABTS in Phosphatpuffer pH 7,0

0,2 ml $10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$ in Phosphatpuffer pH 7,0

Die K_M der PO_{II} für ABTS mit $10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$ bei pH 6,0 war $3,65 \cdot 10^{-3}\text{ Mol/l}$ (s. dazu Abb. 12)

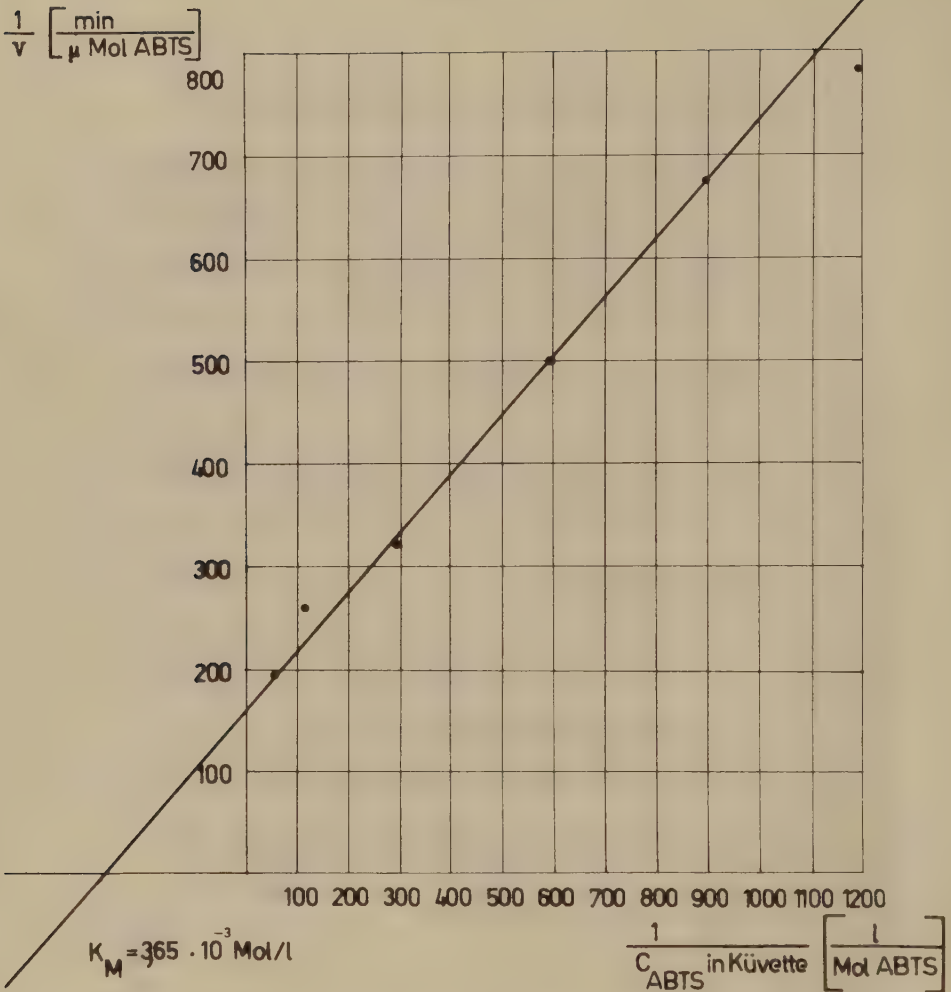


Abb. 12: K_M der Meerrettich- PO_{II} für ABTS mit $10^{-2} \text{ M H}_2\text{O}_2$
 =====
 bei pH 6,0.

Die Angabe " $10^{-2} \text{ M H}_2\text{O}_2$ " bezieht sich auf die H_2O_2 -Konzentration in 0,2 ml. In der Küvette wäre diese dementsprechend $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

β) K_M der PO_{II} für H_2O_2 mit $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS bei pH 6,0

Die K_M der PO_{II} für H_2O_2 wurde bestimmt bei Zugabe von 0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS, d.h. für eine Endkonzentration von $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ Mol ABTS/l}$.

Beschreibung der Methode siehe Seite 56.

ANALYSENANSATZ:

=====

2 ml PO_{II} -Lsg. ($0,02 \mu g PO_{II}/ml$ Phosphatpuffer
pH 6,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

Die K_M der PO_{II} für H_2O_2 mit $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS bei
pH 6,0 betrug $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$ (vgl. Abb. 13).

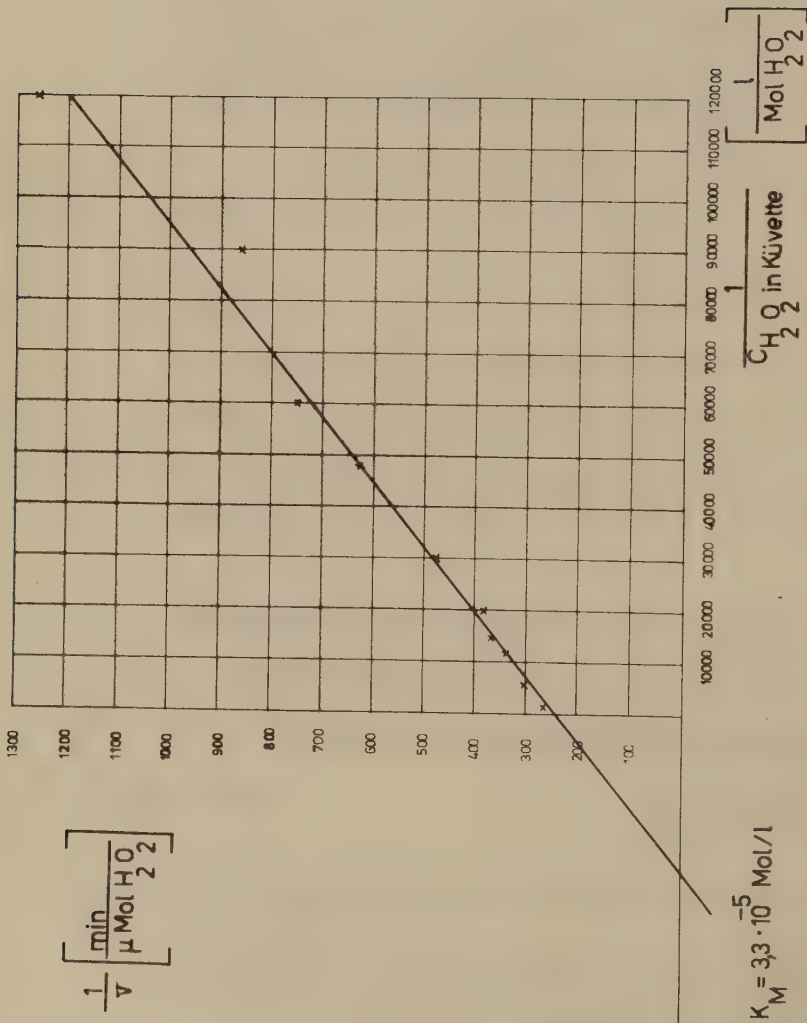


Abb. 13: K_M der Meerrettich- PO_{II} für H_2O_2 mit $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS bei pH 6,0.

Die Angabe " $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS" bezieht sich auf die ABTS-Konzentration in 0,2 ml. Entsprechend wäre diese in der Kuvette $1,7 \cdot 10^{-3} M$.

4) Übersicht: Michaelis-Konstanten für ABTS undH₂O₂ bei pH 7,0 und 6,0.

In den vorangegangenen Versuchen wurden die Michaelis-Konstanten für ABTS und H₂O₂, jeweils bei pH 7,0 und 6,0, gemessen.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 15 und 16 zusammengefaßt.

K_M der PO_{II} für

ABTS:

mit $8,33 \cdot 10^{-5} \text{M H}_2\text{O}_2$	mit $8,33 \cdot 10^{-4} \text{M H}_2\text{O}_2$
$3,4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$	$6,1 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$

K_M der PO_{II} für

H₂O₂:

mit $3,3 \cdot 10^{-4} \text{M ABTS}$	mit $1,7 \cdot 10^{-3} \text{M ABTS}$
$6,3 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$	$16 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/l}$

Tab. 15: Verhalten der Michaelis-Konstanten der
 ===== PO_{II} für ABTS und H₂O₂ jeweils bei zwei
 verschiedenen Substratkonzentrationen
 und bei pH 7,0. Die Konzentrationsangaben
 für H₂O₂ bzw. ABTS beziehen sich auf
 die Endkonzentration in der Küvette.

Aus Tab. 15 wird ersichtlich, daß bei steigender H_2O_2 -Konzentration die K_M der PO_{II} für ABTS größer wird und daß bei zunehmender ABTS-Konzentration die K_M der PO_{II} für H_2O_2 ebenfalls größer wird.

K_M der PO für:

ABTS	H_2O_2
mit $8,33 \cdot 10^{-4} \text{ M } \text{H}_2\text{O}_2$	mit $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ M ABTS}$
$3,6 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/l}$

Tab. 16: Michaelis-Konstanten der PO_{II} für ABTS und H_2O_2 bei pH 6,0.
Die Konzentrationsangaben für H_2O_2 bzw. ABTS beziehen sich auf die Endkonzentration in der Küvette.

Sowohl für ABTS als auch für H_2O_2 war die K_M der PO bei pH 6,0 größer als bei pH 7,0 (vgl. Tab. 15 u. 16).

e) pH-Optimum

Bestimmung der PO -Aktivität bei verschiedenen pH-Werten und Festlegung des pH, bei dem später gemessen werden soll.

Als letzte festzulegende Bedingung zur PO -Bestimmung wurde die PO -Aktivität bei verschiedenen pH-Werten getestet.

In der Literatur ist die pH-Abhängigkeit der PO zwar schon untersucht worden (vgl. Diskussion); da aber das pH-Optimum vom Substrat abhängig sein kann, wurde die PO -Aktivität mit ABTS hier nochmals bestimmt.

In einem Vorversuch wurde zunächst ermittelt, ob sich die Extinktion für einen bestimmten Umsatz bei verschiedenen pH-Werten ändert [1)] .

Danach erfolgten die eigentlichen Messungen der PO-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten und zwar:

die der Meerrettich-PO bei pH 3,0-8,0 [2)] und
die der Lacto-PO bei pH 5,6-7,8 [3)] .

1) Vorversuch:

Abhängigkeit der Farbintensität des dehydrogenierten ABTS vom pH-Wert.

Um festzustellen, ob sich die Extinktion für einen bestimmten Umsatz bei pH 3,0-8,0 ändert, wurde ΔE mit $2 \cdot 10^{-5} \text{ M H}_2\text{O}_2$ bei verschiedenen pHs gemessen. Für jeden pH-Wert wurden zwei Bestimmungen gemacht. Die Ablesung der Werte erfolgte sicherheitshalber nach 6', obwohl in allen Fällen die Reaktion praktisch nach 1' zu Ende gelaufen war.

ANSATZ:

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. ($10 \mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ Puffer m.betr.pH)
0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{ M ABTS}$ in Puffer mit betr. pH
2 ml $2 \cdot 10^{-5} \text{ M H}_2\text{O}_2$ in Puffer mit betr. pH

LEERWERT:

0,2 ml PO_4 -Lsg. (10 μg PO_4 /ml Puffer m.betr.pH)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Puffer mit betr. pH

2 ml Puffer mit betr. pH

Folgende Puffer-
Titrisol-Lösungen
fanden Anwendung:

pH 3: Citrat-Salzsäure

pH 4: Citrat-Salzsäure

pH 5: Citrat-Natronlauge

pH 6: Citrat-Natronlauge

pH 7: Phosphat

pH 8: Borat-Salzsäure

pH	3,0	4,0	5,0
Leerwert	0,194 0,180	0,166 0,166	0,142 0,142
Analyse nach 6'	0,186 0,184	0,808 0,812	0,778 0,777
ΔE	~ 0	0,642 0,646	0,636 0,635

pH	6,0	7,0	8,0
Leerwert	0,143 0,144	0,119 0,118	0,095 0,095
Analyse nach 6'	0,782 0,778	0,760 0,760	0,732 0,731
ΔE	0,639 0,634	0,641 0,642	0,637 0,636

Tab. 17: Extinktionsänderung für einen bestimm-
===== ten Umsatz bei pH 3,0-8,0.

Es ergab sich ein annähernd gleichbleibender
 ΔE -Wert für alle Bestimmungen von pH 4,0-8,0.

Bei pH 3,0 war $\Delta E \sim 0$.

Zusatzversuch:

Um festzustellen, ob das Ausbleiben der Extinktionsänderung bei pH 3,0 auf einer Abnahme der Extinktionsdifferenz zwischen oxidierte und nicht oxidierte Substanz oder auf fehlender Enzymaktivität beruht, wurde der Ansatz mit pH 7,0 nach abgelaufener Reaktion auf pH 3,0 eingestellt. Für diesen neuen Ansatz ergab sich (Mittelwerte):

Leerwert = 0,092

Analyse nach 6' = 0,591

ΔE = 0,499
=====

Nach Multiplikation mit dem Faktor 1,27, der das Volumen dieses Zusatzversuches auf das des Hauptversuches umrechnet, ergab sich $\Delta E = 0.635$,
=====
ein annähernd gleicher Wert wie bei den Messungen von pH 4,0-8,0.

Das bedeutet, daß die PO bei pH 3,0 inaktiviert ist.

Die Extinktion für einen bestimmten Umsatz ändert sich also nicht für einen pH-Bereich von 3,0-8,0.

2) Meerrettich- PO_I

Um das pH-Optimum der Meerrettich- PO_I zu ermitteln, wurde deren Aktivität in einem Bereich vom pH 3,0-8,0 gemessen.

Dazu bestimmten wir für jeden pH-Wert zwei Analysenansätze nach jeweils 1' und 6' und errechneten aus dem Mittelwert der Differenzen ΔE in 1' (vgl. Abb. 14).

Die Puffer wurden für diesen Versuch so hergestellt, daß wir 0,1 M Phosphorsäure und 0,1 M Zitronensäure zu gleichen Volumenteilen zusammengaben. Die Lösung beider Säuren wurde dann mit 1N NaOH auf das jeweilige pH (pH 3,0-8,0) eingestellt und danach mit aq. bidest auf M/30 Phosphat- bzw. Zitrat (also in der Summe auf M/15) verdünnt.

ANALYSENANSATZ:

2 ml PO_I -Lsg. (0,005 $\mu\text{g PO}_I/\text{ml}$ Puffer m.betr. pH)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}\text{M}$ ABTS in Puffer mit betr. pH

0,2 ml $10^{-2}\text{M H}_2\text{O}_2$ in Puffer mit betr. pH

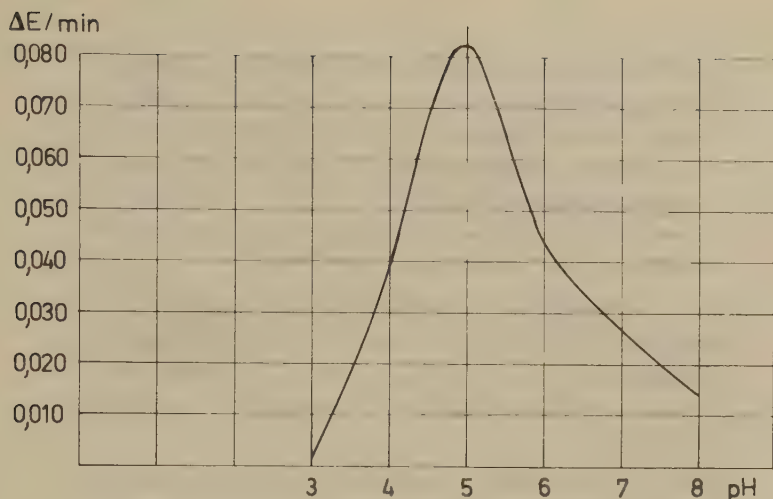


Abb. 14: Aktivität der Meer.- PO_I für einen Bereich von pH
 =====
 3,0-8,0 (vgl. Kurvenbeschreibung im Text).

Aus Abb. 14 wird ersichtlich, daß die Aktivität der Meer.- PO_I bei pH 3,0 nicht meßbar ist und daß sie bei pH 5,0 ein Optimum hat. Beim Übergang von pH 5,0 nach pH 6,0 zeigt sie eine deutliche Abnahme.

3) Lacto-PO

Die Ermittlung des pH-Optimums der Lacto-PO stieß auf größere Schwierigkeiten als bei der Meerrettich- PO_I , da die Lacto-PO schon innerhalb weniger Minuten einen großen Teil ihrer Aktivität verlor (vgl. Tab. 9).

Aus Gründen der Zeitersparnis während der Versuche wurde darum eine Lacto-PO Stammlösung in 0,15 M NaCl ($\sim 0,9\%$) für alle Bestimmungen hergestellt, die dann für die einzelnen pH-Bereiche mit Puffer

des jeweiligen pH-Wertes weiterverdünnt wurde. Um das Volumen der (nicht auf den betr. pH-Wert eingestellten) Stammlösung möglichst klein zu halten, wurden ausnahmsweise 0,2 ml Lacto-PO Stammlösung genommen - dafür 2 ml ABTS (1 : 10 mit Puffer verdünnt, um die sonst übliche Konzentration an ABTS in der Küvette zu erreichen).

Die Anordnung der Versuche erfolgte zunächst so, daß große pH-Intervalle zwischen den Ansätzen bestanden (pH 5,6; 6,2; 6,8; 7,4; 7,8). Nach Festlegung des pH-Optimums dort Messung in Intervallen von 0,2.

Nachträglich erwies es sich als günstig, eine Messung bei pH 5,8 zu ergänzen.

Wegen des zeitlichen Unterschiedes (s.o.) mußten die Messungen aufeinander umgerechnet werden.

Die Lacto-PO Stammlösung wurde in Eiswasser gelagert.

ANALYSENANSATZ:

0,2 ml Lacto-PO Lsg. (0,5 µg Lacto-PO/ml in
0,15 M NaCl)

2 ml, bestehend aus: $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS + Phosphatpuffer, 1 : 10 verdünnt)

0,2 ml 10^{-2} M H_2O_2

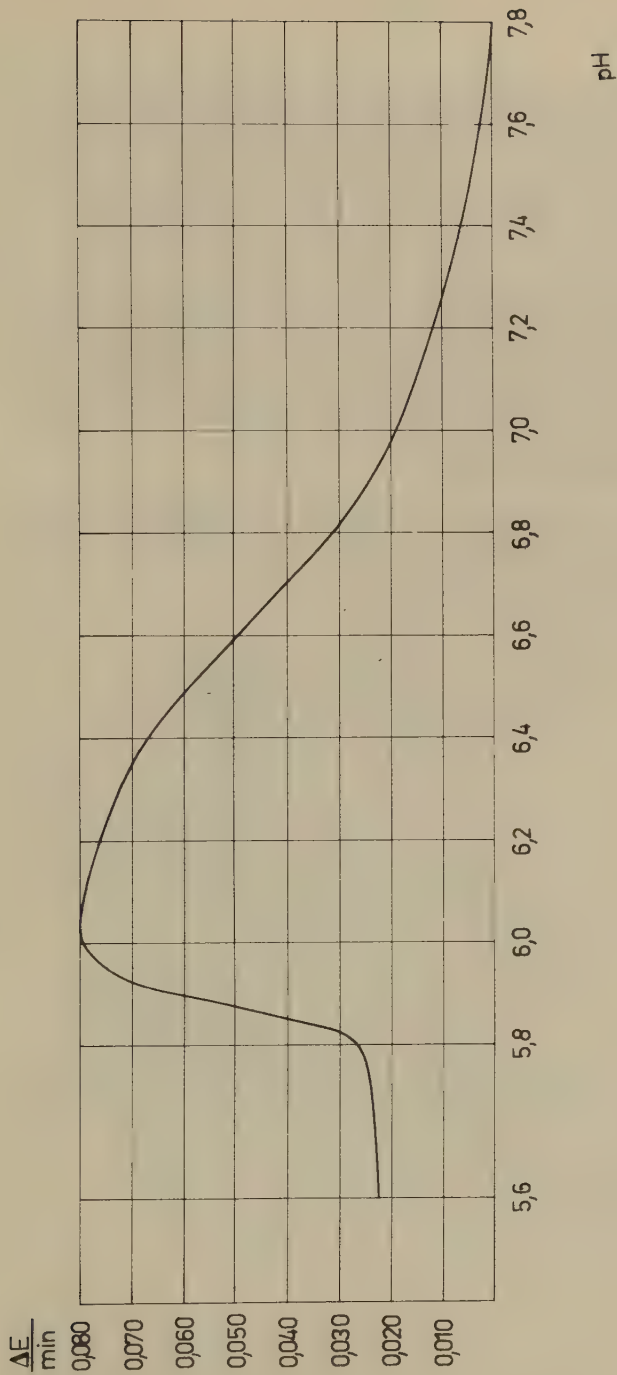


Abb. 15: Aktivität der Lacto-P0 bei verschiedenen pH-Werten
 =====
 (s. dazu die Kurvenbeschreibung im Text).

Aus Abb. 15 wird ersichtlich, daß die Aktivität der Lacto-PO bei pH 5,6-5,8 sehr niedrig ist und bei pH 6,0 ein Optimum zeigt. Für Werte von pH 6,0-6,6 fällt sie langsam und für solche von pH 6,6-7,8 fällt sie schnell auf ein Minimum ab.

In den folgenden Versuchen soll sowohl die Meer.-
als auch die Lacto-PO bei pH 6,0 gemessen werden,
um eine einheitliche Methode für alle PO-Bestim-
mungen zu erhalten.

f) Vorgeschlagene Methode zur Bestimmung der Akti-
vität der Peroxidase

d). Konzentrationen der Reagenzien:

ABTS: Die ABTS-Lsg. ist am besten in der
Konzentration von $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ (in 0,2 ml)
zu verwenden, da sich bei dieser Kon-
zentration eine ausreichende Stabili-
tät des oxidierten ABTS über 15' und
ein Anstieg auf die Endextinktion in
kurzer Zeit ergab (vgl. Tab. 2).

H_2O_2 : Für das H_2O_2 wurde eine 10^{-2} M Lsg.
(in 0,2 ml) gewählt. Der Grund dafür
war eine geringe Inaktivierung der
 PO_{II} durch H_2O_2 bei weitgehender En-
zymsättigung (vgl. den Versuch zu Tab.
12).

β) Aufbewahrung der Lösungen:

ABTS: Das ABTS ist mindestens über 8 h haltbar
(vgl. Tab. 3).

H₂O₂: Das H₂O₂ sollte nach ca. 1 d frisch titriert
sein (vgl. Tab. 14).

PO: Für die PO_{II} gilt, daß sie nicht länger
als 1 h aufbewahrt werden darf (vgl. Tab.
7 + 8).

Die Lacto-PO sollte so schnell wie es tech-
nisch möglich ist eingesetzt werden (Tab. 9).

δ) pH-Wert:

Die PO soll bei pH 6,0 bestimmt werden (näheres
s. Diskussion).

ε) Vorgehen im Einzelnen:

Folgende Reagenzien werden in der nachstehenden
Reihenfolge zugegeben:

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

2 ml PO in Phosphatpuffer pH 6,0
0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0
0,2 ml 10^{-2} M H₂O₂ in Phosphatpuffer pH 6,0

LEERWERT:

2 ml Phosphatpuffer pH 6,0
0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0
0,2 ml 10^{-2} M H₂O₂ in Phosphatpuffer pH 6,0

Die Werte werden nach 1' und 6' abgelesen,
d.h. die Messung erfolgt über 5', und zwar bei
der Hg-Linie 405 nm. Temperatur: 25°C.

g) Eichkurven der Meerrettich- und Lacto-Peroxi-
dasen

Für die Meerrettich- und Lacto-Peroxidase wurde die Substratumsatzgeschwindigkeit bei der jeweiligen PO -Konzentration gemessen [2) u. 3)].

Dazu mußte zunächst in einem Vorversuch der Eichfaktor bei pH 6,0 ermittelt werden [1)] .

1) Vorversuch: Bestimmung des Eichfaktors für
die PO -Eichkurven aus der H_2O_2 -Eichkurve
bei pH 6,0.

Unter den Bedingungen der H_2O_2 -Eichkurve (vgl. Methode dort) wurden vier Ansätze bei pH 6,0 gemessen.

ANSATZ:
=====

ANALYSE:

0,2 ml PO_I -Lsg. (10 μg PO_I /ml Phosphatpuffer
pH 6,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

2 ml H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

LEERWERT:

0,2 ml PO_I -Lsg. (10 μg PO_I /ml Phosphatpuffer
pH 6,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

2 ml Phosphatpuffer pH 6,0

H ₂ O ₂ -Konz. [Mol/l] in 2 ml	$0,5 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}
Analyse nach 4'	0,317	0,471
Leerwert (Mittelwert)	0,161	0,161
ΔE	0,156	0,310

H ₂ O ₂ -Konz. Mol/l in 2 ml	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-5}$
Analyse nach 4'	0,624	0,766
Leerwert (Mittelwert)	0,161	0,161
ΔE	0,463	0,605

Tab. 18: Beziehung zwischen H₂O₂-Konzentration
 ===== und Extinktion bei pH 6,0 (vgl. Abb. 16).

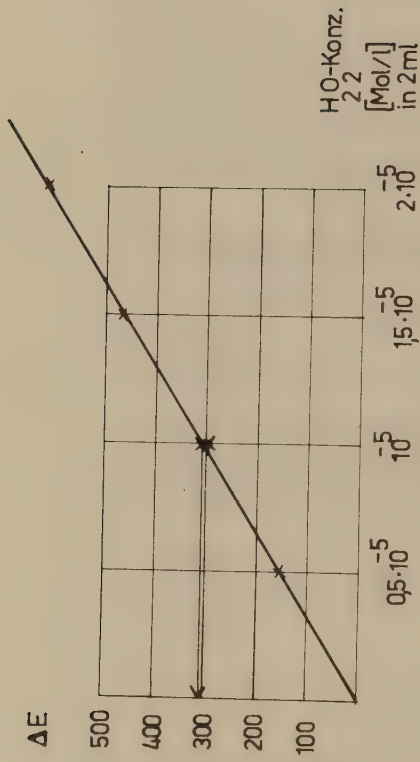


Abb. 16: H₂O₂-Eichkurve bei pH 6,0 zur Ermittlung des Eichfaktors
für die PO-Eichkurven (vgl. Tab. 18).

Berechnung des Eichfaktors:

bezogen auf Konzentration:

$$10^{-5} \text{ Mol H}_2\text{O}_2/1 \rightarrow \Delta E = 0,310$$

bezogen auf Menge:

$$10^{-8} \text{ Mol H}_2\text{O}_2 \rightarrow \Delta E = 0,155$$

$$\boxed{1 \mu \text{ Mol H}_2\text{O}_2 \rightarrow \Delta E = 15,5} \quad +$$

2) Meerrettich-PO_I

Die Substratumsatzgeschwindigkeit der PO_I wurde für einen Bereich von 0,002-0,1 $\mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$ (in 2 ml; entsprechend 0,004-0,2 $\mu\text{g PO}_\text{I}$ im Ansatz) bei pH 6,0 gemessen.

Dazu lasen wir jeden Analysenansatz nach 1' und 6' ab und errechneten aus der Extinktionsdifferenz mit Hilfe des Eichfaktors die Substratumsatzgeschwindigkeit (vgl. Tab. 19).

 +Anmerkung: Der Eichfaktor bei pH 6,0 hat sich gegenüber dem Eichfaktor bei pH 7,0 (vgl. Berechnungen bei "H₂O₂-Eichkurve") nicht geändert. Dies entspricht den Ergebnissen des Versuchs: "Abhängigkeit der Farbindensität des dehydrogenierten ABTS vom pH-Wert (vgl. dort).

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

2 ml Meer.- PO_4 in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml 10^{-2} M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

LEERWERT:

2 ml Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml 10^{-2} M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

PO-Menge [μg im Ansatz]	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,03	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2
PO-Konz. [$\mu\text{g}/\text{ml}$] 2 ml	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,015	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
Analyse nach															
1'	0,133	0,154	0,179	0,198	0,203	0,246	0,303	0,400	0,510	0,600	0,684	0,780	0,910	0,937	1,010
6'	0,240	0,352	0,483	0,601	0,676	0,932	1,265	1,805	2,405	3,075	3,570	4,070	4,475	4,780	5,040
ΔE in 5'	0,107	0,198	0,310	0,403	0,4746	0,686	0,962	1,405	1,895	2,475	2,886	3,290	3,565	3,843	4,030
ΔE in 1'	0,0214	0,0396	0,062	0,0806	0,0949	0,1372	0,1924	0,281	0,379	0,495	0,5772	0,658	0,713	0,7686	0,806
v [$\frac{\mu\text{MolH}_2\text{O}_2}{\text{min}}$]	0,00138	0,00255	0,004	0,0052	0,00612	0,00885	0,01241	0,01813	0,02445	0,03194	0,03724	0,04245	0,046	0,04959	0,052

Tab. 19: Substratsatzgeschwindigkeit der PO_I für einen Bereich von 0,04–0,2 $\mu\text{g PO}_I$
 im Ansatz (vgl. Abb. 17)

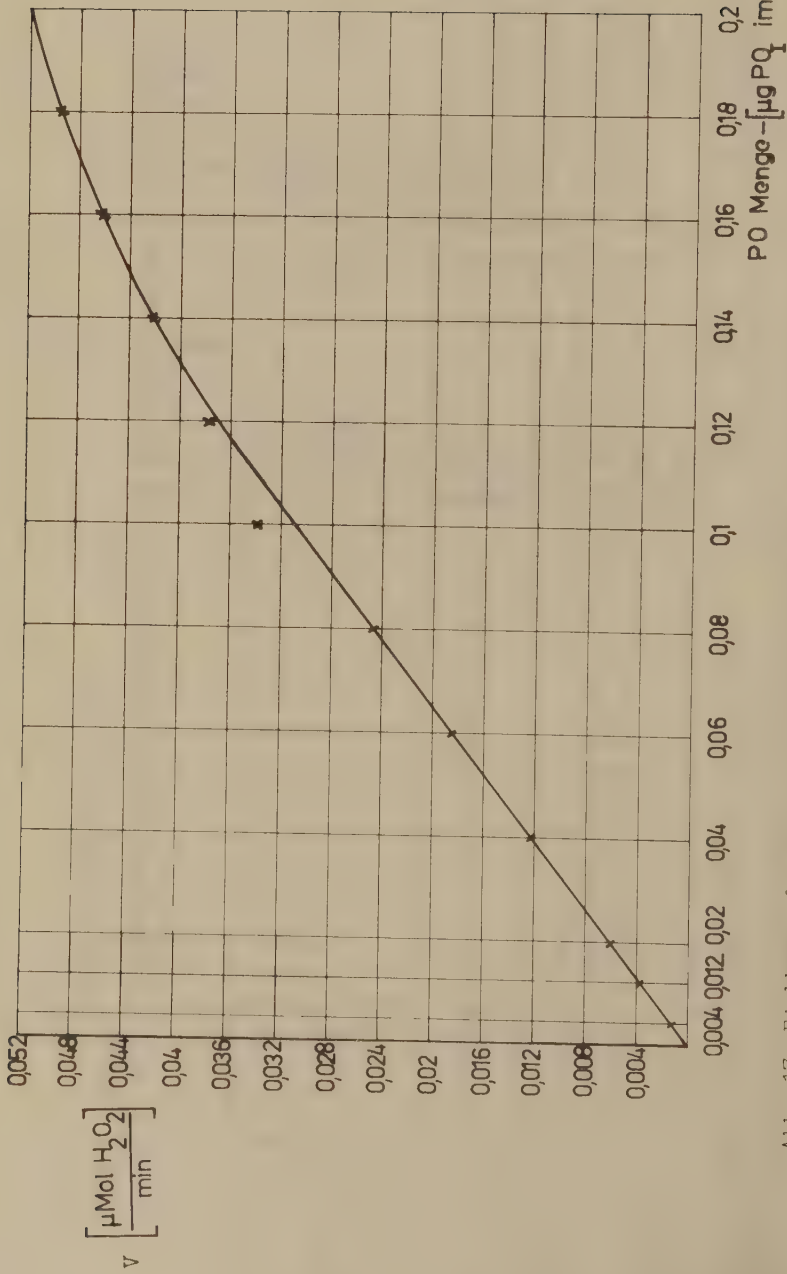


Abb. 17: Eichkurve der Meerrettich-PO_I bei pH 6,0 (s. dazu Tab. 19).

Die Eichkurve der Meerrettich- PO_I geht durch den Nullpunkt und verläuft bis $0,06 \mu\text{g PO}_I/\text{ml}$ (entsprechend $0,12 \mu\text{g PO}_I$ im Ansatz) geradlinig. Bei höheren PO_I -Konzentrationen weicht die Kurve ab wegen der H_2O_2 -Eichkurve, die bei Extinktionen $>2,8$ nicht mehr das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt.

3) Lacto-PO

Für einen Bereich von $0,004$ – $0,04 \mu\text{g Lacto-PO}/\text{ml}$ (entsprechend $0,008$ – $0,08 \mu\text{g Lacto-PO}$ im Ansatz) wurde die Substratumsatzgeschwindigkeit bei pH 6,0 gemessen.

Da die Aktivität der Lacto-PO sehr schnell nachläßt, wurden zwei zeitlich getrennte Meßreihen gemacht. Die Aktivität der zweiten Meßreihe rechneten wir mit Hilfe eines Faktors⁺ auf die der ersten um. Die PO-Lsg. wurde in Eiswasser gelagert.

ANALYSENANSATZ:

=====

2 ml Lacto-PO in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml 10^{-2}M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

⁺Der Faktor (= Proportionalitätsfaktor für die Änderung der Enzymaktivität) wurde mit Hilfe eines Anschlußwertes in der zweiten Meßreihe ermittelt.

PO-Menge [$\mu\text{g im Ansatz}$]	0,008	0,016	0,024	0,032	0,04		0,04	0,06	0,08
PO-Konz. [$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$]	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020		0,020	0,030	0,040
Analyse nach 1' 6'	0,158 0,165	0,161 0,175	0,163 0,183	0,180 0,206	0,168 0,203	Der Faktor er- rechnete sich aus den Bezugswerten bei 0,020 $\mu\text{g PO/}$ ml: $0,007:0,0074 =$ $0,95$ =====	0,165 0,202	0,185 0,244	0,194 0,267
ΔE in 5'	0,007	0,014	0,020	0,026	0,035		0,037	0,059	0,073
" " 1'	0,0014	0,0028	0,004	0,0052	0,007		0,0074	0,0118	0,0146
: 15,5 = v [$\frac{\mu\text{MolH}_2\text{O}_2}{\text{min}}$]	0,0000964	0,0001805	0,000258	0,000335	0,000452		0,000478	0,000762	0,000943
v-Faktor 0,95							0,000452	0,000722	0,000895

Tab. 20: Substratumsatzgeschwindigkeit der Lacto-PO für einen Bereich von 0,008-0,08 μg Lacto-PO im Ansatz (vgl. Abb. 18).

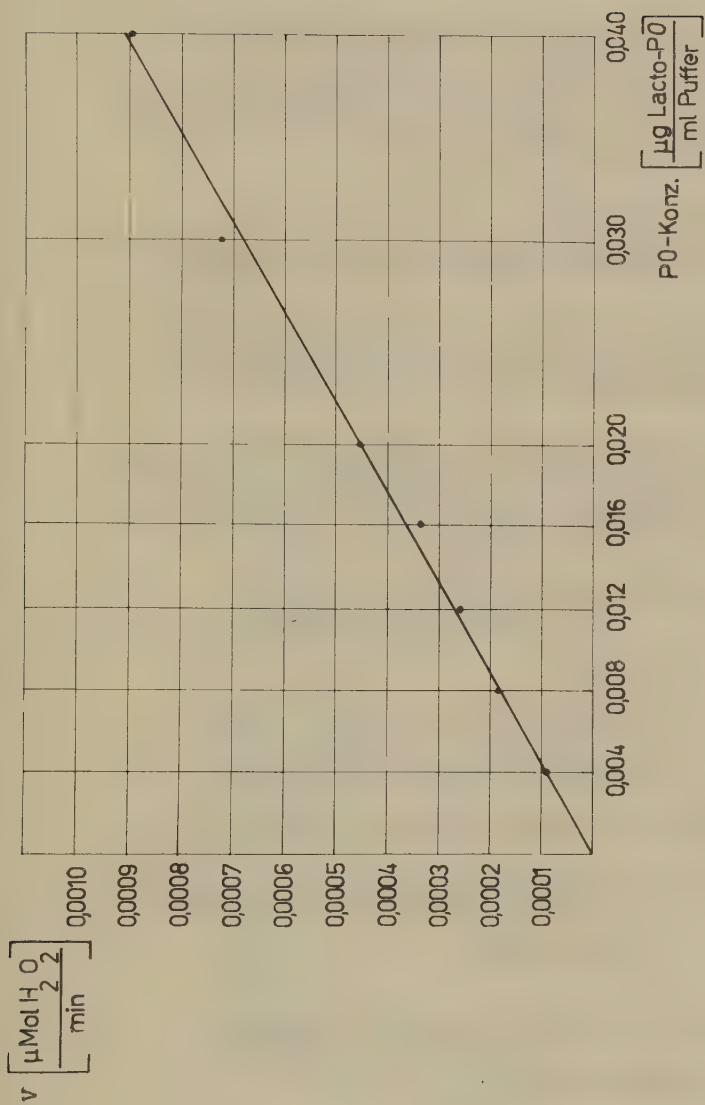


Abb. 18: Eichkurve der Lacto-P0 bei pH 6,0 (vgl. Tab. 20)

Die Eichkurve der Lacto-PO geht durch den Nullpunkt und verläuft bis 0,04 μg Lacto-PO/ml (entspr. 0,08 μg Lacto-PO im Ansatz) geradlinig. Sie erfüllt damit für den angegebenen Bereich das Lambert-Beer'sche Gesetz.

h) Empfindlichkeit der Bestimmung der Peroxidasen

Die Empfindlichkeit der PO-Bestimmung wird definiert als Quotient aus Extinktionsdifferenz und PO-Konzentration:

$$\text{Empfindlichkeit} = \frac{\Delta E \text{ in } 5'}{\text{PO-Konzentr.}} \left[\frac{\text{ml}}{\text{ng}} \right]$$

1) Für die Empfindlichkeit der Meer.-PO_I

ergibt sich:

$$60 \text{ ng Meer.-PO}_I/\text{ml} \rightarrow \Delta E \text{ in } 5' = 2,886$$

$$1 \text{ ng Meer.-PO}_I/\text{ml} \rightarrow \Delta E \text{ in } 5' = 0,048$$

(vgl. Messungen zur Meer.-PO_I Eichkurve)

d.h.: Empfindlichkeit der Meer.-PO_I Lsg. =

$$\underline{0,048 \text{ pro ng/ml}}$$

2) Für die Empfindlichkeit der Lacto-PO

ergibt sich:

20 ng Lacto-PO/ml $\rightarrow \Delta E$ in 5' = 0,035

1 ng Lacto-PO/ml $\rightarrow \Delta E$ in 5' = 0,00175

(vgl. Messungen zur Lacto-PO Eichkurve)

d.h.: Empfindlichkeit der Lacto-PO Lsg. =

0,00175 pro ng/ml

i) Untere Nachweisgrenze von Meerrettich- PO_I

Als untere Nachweisgrenze von Meerrettich- PO_I bezeichnet man die unterste PO_I -Konzentration, bei der sich die Zunahme von den Analysen (mit minimaler PO_I -Konzentration) nach 5' signifikant von der Zunahme der Leerwerte (ohne PO_I) nach 5' unterscheidet.

Zur Bestimmung der unteren Nachweisgrenze wurden unter den Bedingungen der PO_I -Eichkurve (vgl. Methodik dort) 10 Analysen mit 0,0001 μg PO_I /ml und 10 Leerwerte gemessen, um dann die Signifikanz des Unterschiedes errechnen zu können.

ANSATZ:

=====

ANALYSE:

2 ml PO_I -Lsg. (0,0001 μg PO_I /ml Phosphatpuffer
pH 6,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} M$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml 10^{-2} M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

LEERWERT:

2 ml Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml 10^{-2} M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

Nr.	Analyse nach 1'	nach 6'	ΔE in 5'
1	0,126	0,133	0,007
2	0,127	0,133	0,006
3	0,124	0,132	0,008
4	0,124	0,130	0,006
5	0,123	0,129	0,006
6	0,123	0,131	0,008
7	0,128	0,129	0,001
8	0,125	0,131	0,006
9	0,127	0,132	0,005
10	0,127	0,132	0,005

Nr.	Leerwert nach 1'	nach 6'	ΔE in 5'
1	0,120	0,126	0,006
2	0,123	0,129	0,006
3	0,127	0,131	0,004
4	0,123	0,127	0,004
5	0,122	0,124	0,002
6	0,124	0,128	0,004
7	0,122	0,124	0,002
8	0,121	0,124	0,003

Fortsetzung Leerwert

Nr.	nach 1'	nach 6'	ΔE in 5'
9	0,122	0,127	0,005
10	0,128	0,130	0,002

Tab. 21: Je 10 Messungen mit $0,0001 \mu\text{g PO}_I/\text{ml}$
 ===== und ohne PO_I zur Errechnung der Signi-
 fikanz des Unterschiedes.

$0,05 > p > 0,01$ (schwach signifikant)

d.h.: Als untere Nachweisgrenze der PO_I ergab
 =====
sich $0,1 \text{ ng PO}_I/\text{ml}$

Da die Signifikanz hier schwach war, wurde da-
 rauf verzichtet, noch kleinere Konzentrationen
 zu prüfen.

Relative Standardabweichung von 10 Analysen

(mit $0,0001 \mu\text{g PO}_I/\text{ml}$) und 10 Leerwerten (ohne
 PO_I)

Für die in Tab. 21 aufgeführten Analysen und
 Leerwerte errechneten wir jeweils die relative
 Standardabweichung.

ANALYSEN: (vgl. Tab. 21)

Mittelwert: $0,0058$
 Relative Standardabweichung: 34%

LEERWERTE: (vgl. Tab. 21)

Mittelwert: 0,0038⁺)

Relative Standardabweichung: 41 %

j) Präzision der Bestimmung der Meerrettich- PO_I

Zur Ermittlung der Präzision der PO -Bestimmung errechneten wir die relative Standardabweichung von 10 Werten in einem günstigen Meßbereich.

Eine PO_I -Konzentration von 0,008 $\mu\text{g/ml}$ (vgl. Abb. 17) erschien geeignet und wurde darum in einem Ansatz von 10 Analysen getestet. Dabei fanden dieselben Reagenzien wie bei der PO_I -Eichkurve Anwendung und auch die übrigen Versuchsbedingungen waren genau wie dort.

ANALYSENANSATZ:

=====

2 ml PO_I -Lsg. (0,008 $\mu\text{g } PO_I / \text{ml}$ Phosphatpuffer
pH 6,0)

0,2 ml $2 \cdot 10^{-2} \text{M}$ ABTS in Phosphatpuffer pH 6,0

0,2 ml 10^{-2}M H_2O_2 in Phosphatpuffer pH 6,0

+) Da die nicht-enzymatische Oxidation in der Meßzeit sehr klein ist, stört sie die Bestimmung der PO kaum.

Analyse Nr.	nach 1'	nach 6'	E in 5'
1	0,197	0,567	0,370
2	0,199	0,567	0,368
3	0,195	0,567	0,372
4	0,197	0,558	0,361
5	0,198	0,572	0,374
6	0,195	0,573	0,378
7	0,198	0,568	0,370
8	0,195	0,561	0,368
9	0,201	0,558	0,357
10	0,198	0,578	0,380

Tab. 22: Relative Standardabweichung von
 ===== 10 Analysen mit 0,008 $\mu\text{g PO}_\text{I}/\text{ml}$
 zur Errechnung der Präzision der
 PO_I -Bestimmung.

Der Mittelwert betrug: 0,370

Die relative Standardabweichung war: 1,9 %

E. DISKUSSION

=====

Mit Hilfe des neuen Substrates ABTS wurde eine Methode zur Bestimmung des H_2O_2 und der PO entwickelt.

Als Voraussetzung der Bestimmung der PO mußte zunächst

- (I) eine H_2O_2 -Eichkurve erstellt und die analytischen Parameter der Konzentrationsermittlung des H_2O_2 festgelegt werden.

Der Haupt-Zweck der vorliegenden Arbeit war jedoch

- (II) die Bestimmung der PO.

In der bisher erschienenen Literatur ist das ABTS zwar schon erwähnt worden, aber nicht zum Zweck der PO- sondern dem der Glucose-Messung [2,3,4,5]. Diese beruht zwar indirekt auf einer H_2O_2 -Bestimmung, aber die Versuchsbedingungen sind bei anderen Autoren nicht speziell auf die H_2O_2 -Ermittlung zugeschnitten und auch nicht hinsichtlich ihrer analytischen Qualitäten überprüft. Speziell die kinetischen Anforderungen für eine enzymatische Aktivitätsbestimmung sind noch nicht überprüft worden. Neu an der Arbeit bezüglich (I) ist weiterhin die Festlegung der analytischen Parameter (Empfindlichkeit, untere Nachweisgrenze, Präzision) und die Beschreibung einer Methode zur H_2O_2 -Messung.

Ferner liegt Literatur vor zur Messung des H_2O_2 mit anderen, nicht optimalen Substraten, so z.B. mit o-Dianisidin [41]. Diese Methode findet z.B. Anwendung auf die Galaktose- [26] und die Katalase-Bestimmung [27].

Die beschriebene Methode zur Bestimmung des H_2O_2 und der PO mittels ABTS zeichnet sich u.a. durch ihre einfache Handhabung aus. Das dehydrogenierte ABTS zeigt eine starke Absorption mit Maximum bei 420 nm, die bei 405 nm nicht wesentlich geringer ist und darum bei dieser Hg-Linie im Eppendorff-Photometer gemessen werden kann. Das Spektrum, das mit dem von anderen Autoren [3, 42] gemessenen übereinstimmt, weist

noch ein weiteres, schwächeres Absorptionsoptimum bei 730 nm auf.

Als Nebenergebnis kann aus der Art des Spektrums auf die Art des Oxidationsproduktes geschlossen werden; unter den in unseren Versuchen bestehenden Reaktionsbedingungen bildet sich das einwertige Reaktionsprodukt bzw. Semichinon [3, 42]:



Zu I: Für die H_2O_2 -Eichkurve fanden wir, daß die Extinktion ===== der H_2O_2 -Konzentration bis zu $8 \cdot 10^{-5}$ Mol H_2O_2 pro l proportional ist. Oberhalb von $8 \cdot 10^{-5}$ Mol H_2O_2 pro l war der Verlauf nicht mehr geradlinig. Das Lambert-beer'sche Gesetz ist also für einen Bereich von mehr als 2 Zehnerpotenzen erfüllt.

Die Empfindlichkeit der Methode der H_2O_2 -Bestimmung mit ABTS ist mehr als viermal höher als die mit o-Dianisidin [43]: während die des o-Dianisidins mit $8 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ angegeben wird [2], ergaben die eigenen Versuche mit ABTS $\epsilon = 37,2 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von einigen Autoren, die die Glucose-Bestimmung untersucht haben [3], überein ($36,8 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$), während andere [4] $\epsilon = 21,6 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ fanden.

Die entsprechende Empfindlichkeit der Bestimmung des H_2O_2 mit Guajakol ist mit $10,2 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$ [28] im Vergleich zum o-Dianisidin zwar immer noch ein wenig höher. Sie erreicht jedoch noch lange nicht die des ABTS, sondern ist im Vergleich zu dieser um den Faktor 3,7 kleiner. Darüber hinaus hat Guajakol den Nachteil,

+)
D = Donator

daß es kein einheitliches Reaktionsprodukt bildet [31, 32] ⁺⁾ . Die untere Nachweisgrenze für H_2O_2 ist mit der beschriebenen Methode sehr niedrig. Nach den Versuchen mit dem von uns entwickelten Verfahren liegt sie bei 6,8 ng H_2O_2 pro ml⁺⁺⁾.

Damit ist - soweit wir feststellen konnten - die Bestimmung des H_2O_2 mittels ABTS diejenige mit der tiefsten unteren Nachweisgrenze. Andere Autoren, z.B. [3], sind auf die Analytik der Bestimmung des H_2O_2 nicht näher eingegangen. Bei der Festlegung der unteren Nachweisgrenze für H_2O_2 war die eigene Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,001$; ein vergleichbarer Wert dazu liegt in der ausgewerteten Literatur [1-47] nicht vor.

Der Versuch über die Präzision der Bestimmung des

H_2O_2 ergab eine relative Standardabweichung von 0,5 % im günstigen Meßbereich. Bei sehr kleinen H_2O_2 -Konzentrationen wird die Präzision jedoch schlechter. Ein vergleichbarer Wert dazu liegt zwar - unseres Wissens - nicht vor, jedoch fanden wir bei einigen Autoren [4, 5] Angaben über die relative Standardabweichung der Glucose-Bestimmung (3,6 % bzw. 2,0 %), die ja auch eine Bestimmung des H_2O_2 beinhaltet.

Da sich die beschriebene Methode u.a. durch eine hohe Empfindlichkeit, eine niedrige untere Nachweisgrenze

⁺⁾ Die Empfindlichkeit der Bestimmung des H_2O_2 mit den verschiedenen Chromogenen bezieht sich jeweils auf die Messung bei denjenigen Wellenlängen, die von den betr. Autoren angegeben werden. Dies ist für:
 ABTS: 405 nm [3, eigene Versuche], o-Dianisidin: 436 nm [2]
 ABTS: 420 nm [4] Guajakol: 436 nm [28].

⁺⁺⁾ Entsprechend $2 \cdot 10^{-7}$ bzw. $3 \cdot 10^{-7}$ Mol H_2O_2 pro l.

und eine gute Präzision auszeichnet (s.o.), läßt sie sich allgemein überall dort anwenden, wo kleine H_2O_2 -Konzentrationen auf einfachem Wege bestimmt werden sollen (vgl. später).

Zu II:
===== Aktivitätsmessungen der PO mittels ABTS gibt es - unseres Wissens - nicht, sondern nur Bestimmungsverfahren der PO mit anderen Substraten, die zum Teil hinsichtlich ihrer Analytik nicht näher beschrieben sind.

Daraus ergab sich die Aufgabe der Festlegung der optimalen Reaktionsbedingungen mit ABTS (Konzentrationen der Reagenzien, pH-Optimum, Meßzeit) und der Bestimmung der analytischen Qualitäten der Methode mit ABTS (Empfindlichkeit, untere Nachweisgrenze, Präzision). Ferner die Beschreibung einer Methode zur Bestimmung der PO-Aktivität, und, wo möglich, Vergleich des eigenen Verfahrens gegenüber denen mit anderen Substraten.

Bei der Bestimmung der günstigsten H_2O_2 -Konzentration entstand die Schwierigkeit, die H_2O_2 -Konzentration einerseits nicht zu hoch zu wählen, da dann Peroxidasen gehemmt werden können; andererseits hat eine zu geringe H_2O_2 -Konzentration den Nachteil einer mangelnden Enzymsättigung und fehlender Proportionalität.

Der Versuch über die Inaktivierung der Meer.-PO durch H_2O_2 (Tab. 10) ergab, daß bei einer H_2O_2 -Konzentration von 10^{-2} M (in 0,2 ml)⁺ einerseits die PO nur geringgradig gehemmt, andererseits aber das Enzym weitgehend gesättigt war. Hinzu kommt, daß bei der Messung der Substratumsatzgeschwindigkeiten für ABTS bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen die K_M für

⁺) entsprechend $0,83 \cdot 10^{-3}$ M H_2O_2 in der Küvette

ABTS mit 10^{-2} M H_2O_2 sehr klein bzw. die Aktivität des Enzyms bei dieser H_2O_2 -Konzentration am größten war (Abb. 8 u. 9).

Nach den eigenen Versuchen mit der Lacto-PO (Tab. 11) ergab sich ein Optimum bei $0,42 \cdot 10^{-3}$ M H_2O_2 (H_2O_2 -Konzentration bezogen auf das Gesamtvolumen in der Küvette). Vergleich dazu fanden wir in der Literatur [44] ein Optimum der tierischen PO (aus der gl. submaxillaris) bei $1,2 \cdot 10^{-3}$ M H_2O_2 . Der Unterschied ist wahrscheinlich mit Hilfe der verschiedenen Herkunft der Enzyme zu deuten.

Trotz der für die einzelnen PO-Arten verschiedenen H_2O_2 -Optima soll für alle Peroxidasen diejenige H_2O_2 -Konzentration empfohlen werden, die für die Meer.-PO optimal ist ($0,83 \cdot 10^{-3}$ M in der Küvette). Der Grund dafür war, daß es uns auf eine Methode ankam, die für die Bestimmung aller Peroxidasen verwandt werden kann.

Als beste ABTS-Konzentration stellte sich $2 \cdot 10^{-2}$ M (in 0,2 ml) heraus, da sich bei diesem Wert eine ausreichende Stabilität des dehydrogenierten ABTS über 15' und ein Anstieg auf die Endextinktion in kurzer Zeit ergab (Abb. 3). Eine weitere Erhöhung der ABTS-Konzentration wäre ungünstig, da dann auch der Leerwert zu stark erhöht würde.

Die Bestimmung der Substratumsatzgeschwindigkeiten der Meer.-PO für H_2O_2 bei verschiedenen ABTS-Konzentrationen ergab zwar eine höhere Aktivität der PO bei einer anderen ABTS-Konzentration ($4 \cdot 10^{-3}$ M, vgl. Abb. 10 u. 11); jedoch erschien uns in diesem Fall die größere Präzision (zeitliche Stabilität), die bei $2 \cdot 10^{-2}$ M ABTS gegeben war, gegenüber einer höheren Empfindlichkeit bzw. einer höheren PO-Aktivität bei $1 \cdot 10^{-3}$ M ABTS vorrangig.

Mit höheren ABTS-Konzentrationen wurde die K_M für H_2O_2 größer, mit höheren H_2O_2 -Konzentrationen nahm die K_M für ABTS zu. Die Michaelis-Konstanten für beide Substrate verhalten sich also bei Konzentrationserhöhung des jeweils anderen Substrates gleichsinnig, indem sie sich erhöhen. Die Affinität des Enzyms zu dem einen Substrat ist in jedem Falle abhängig von der Konzentration des anderen Substrates. Um die Kausalität dieses Zusammenhanges zu prüfen, müßten noch weitere Untersuchungen angestellt werden.

Die pH-Optima waren für die Meer.- und die Lacto-PO unterschiedlich (vgl. Abb. 14 u. 15). Während wir für die Meer.-PO in Übereinstimmung mit Anderen [45] ein pH-Optimum bei 5,0 fanden, lag dieses für die Lacto-PO nach den eigenen Versuchen bei pH 6,0. Das letztere Ergebnis stimmt mit dem von Autoren überein, die die tierische PO getestet haben [44]. Andere dagegen geben das pH-Optimum der PO mit 7,0 an, ohne jedoch die Herkunft der verwandten PO näher zu bezeichnen [3, 5]. Weitere Autoren, bei denen eine Angabe über die Art der PO nicht zu finden war [2, 4], messen ebenfalls bei pH 7,0, machen aber keine Angabe darüber, ob ihre Messungen im pH-Optimum erfolgt waren.

In der vorgeschlagenen Methode sollen aus Gründen der Vereinheitlichung alle Peroxidasen bei pH 6,0 gemessen werden. Wenn jedoch die pH-Optima der verschiedenen Peroxidasen im Einzelfall berücksichtigt werden, können Genauigkeit und Empfindlichkeit der Bestimmung gesteigert werden.

Die günstigste Meßzeit war für die Lacto-PO wegen ihres schnellen Aktivitätsverlustes von 1'-6' nach dem Start der Reaktion. Für die Meer.-PO wurde zwecks Vereinheitlichung der Methode dieselbe Zeit empfohlen, obwohl in diesem Fall die Aktivität längere Zeit kon-

stant blieb. Durch Messung der Meer.-PO über 10' kann die Empfindlichkeit der Methode erhöht werden (vgl. später).

Für die Eichkurve der Meer.-PO_I (Abb. 17) fanden wir einen geradlinigen Verlauf bis zu einer PO-Menge von 0,2 µg im Ansatz. Oberhalb dieses Wertes war die Kurve nicht mehr geradlinig. Dies ist durch die H₂O₂-Eichkurve zu erklären, die bei höheren Extinktionen als 2,8 unterhalb des Proportionalitätsbereichs verläuft. Die Lacto-PO wurde wegen ihres starken Aktivitätszerfalls nur über einen kleineren Bereich (bis zu 0,08 µg Lacto-PO im Ansatz) gemessen. Bis zu diesem Wert verlief die Eichkurve geradlinig (Abb. 18).

Unter den vorher festgelegten Bedingungen betrug die Empfindlichkeit der Bestimmung der Meer.-PO_I-Lsg. 0,048 pro ng/ml, die der Bestimmung der Lacto-PO-Lsg. 0,00175 pro ng/ml.

Mit der neu entwickelten Methode ließ sich noch eine PO_I-Konzentration von 0,1 ng pro ml nachweisen (= untere Nachweisgrenze). Da die Signifikanz hier schwach war, verzichteten wir darauf, noch kleinere Konzentrationen zu prüfen.

Die Empfindlichkeit der Methode kann theoretisch erhöht und die untere Nachweisgrenze theoretisch erniedrigt werden, wenn die Laufzeit der Reaktion länger ist. Wegen der Aktivitätsabnahme der PO ist jedoch bewußt nicht über eine längere Zeit gemessen worden.

Bei der von uns festgelegten Versuchsanordnung zur Bestimmung der PO mit ABTS ergab sich eine relative Standardabweichung von 1,9 %.

Ein vergleichbarer Wert bezüglich der Präzision liegt bei der Methode der Bestimmung der PO mit Guajakol vor [28]. Dort ist die Standardabweichung mit 1,03 % angegeben, wenn man innerhalb einer Zeit von 1'-3' mißt.

Aus den beschriebenen Ergebnissen wird ersichtlich, daß das ABTS nicht nur zur Bestimmung des H_2O_2 , sondern auch zu der der PO verwandt werden kann. Das ABTS erfüllt (im Gegensatz zu anderen Leukofarbstoffen) nicht nur alle in der Einleitung genannten Bedingungen, sondern darüber hinaus ist die mit ABTS als Substrat entwickelte Methode sehr präzise und ermöglicht den Nachweis kleinster PO-Konzentrationen bis zu 0,1 ng pro ml. Hinzu kommt, daß Kanzerogenität (im Gegensatz zum o-Dianisidin [28]) zumindest nicht nachgewiesen ist. Weder ABTS noch ihm verwandte Stoffe sind in Richtlinien über Kanzerogene [46, 47] aufgeführt.

Anwendungsmöglichkeiten der Bestimmung des H_2O_2 mit der beschriebenen ABTS-Methode sind überall dort gegeben, wo kleinste H_2O_2 -Konzentrationen möglichst einfach ermittelt werden sollen.

Dies trifft auch für solche Bestimmungen zu, die letztlich auf einer H_2O_2 -Konzentrationsermittlung beruhen. Speziell ist zu vermuten, daß die Methode sehr wahrscheinlich auch auf die Galaktose- und Katalase-Bestimmung anwendbar sein wird.

F. LITERATUR
=====

1. INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY
 Enzyme Nomenclature
 Recommendations on the Nomenclature and Classification
 of Enzymes, together with their Units and Symbols of
 Enzyme Kinetics.
 Elsevier Publishing Company, New York, S. 7 (1965)
2. GAWEHN, K., WIELINGER, H., WERNER, W.
 Screening von Chromogenen für die Blutzuckerbestimmung
 nach der GOD/POD-Methode.
 Z. Anal.Chem. 252, 222-227 (1970)
3. WERNER, W., REY, H.-G., WIELINGER, H.
 Über die Eigenschaften eines neuen Chromogens für die
 Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode.
 Z. Anal.Chem. 252, 224-228 (1970)
4. KAHLE, K., WEISS, L., KLARWEIN, M., WIELAND, O.
 Klinisch-chemische Erfahrungen mit einem neuen Chromo-
 gen für die Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD-Methode
 unter Verwendung eines automatischen Analysiergerätes.
 Z. Anal. Chem. 252, 228-231 (1970)
5. DEUSER, K.H., SITZMANN, F.C.
 GOD-Perid-Methode zur Blutzuckerbestimmung.
 Med. Klin. 67, 1406-1409 (1972)
6. MAEHLY, A.C.
 Myeloperoxidase
 in: Methods in Enzymology, Bd. 2, hgg. v. S.P. Colowick
 u. N.O. Kaplan,
 Academic Press. Inc., New York, 794-801 (1955)
7. MAEHLY, A.C.
 Plant Peroxidase
 in: Methods in Enzymology, Bd. 2, hgg. v. S.P. Colowick
 u. N.O. Kaplan,
 Academic Press Inc., New York, 801-813 (1955)

8. SAUNDERS, B.C., HOLMES-STEDLE, A.G., STARK, B.P.
Peroxidase.
Butterworths Verlag, London, S. 6 (1964)
9. ALTSCHUL, A.M., ABRAMS, K., HOGNESS, T.R.
Cytochrome C Peroxidase.
J. biol. Chem. 136, 777-794 (1940)
10. MEYER, E.
Beiträge zur Leukozytenfrage.
Münch.med.Wschr. 50, 1489-1493 (1903)
11. BRANDENBURG, K.
Über die Reaction der Leukocyten auf die Guajakinctur.
Münch. med. Wschr. 47, 183-186 (1900)
12. VERCAUTEREN, R.
Myeloperoxidase.
Arch. Int. Physiol. Biochim. 65, S. 165 (1957)
13. ARNOLD, K.
Einige neue Reaktionen der Milch.
Arch. exp. Path. Pharmac. 219, 41-42 (1881)
14. ELLIOTT, K.A.C.
Milk Peroxidase.
Biochem. J. 26, 10-24 (1932)
15. GRIMMER, W., TEITELBAUM, M.
Weitere Untersuchungen über die Milchperoxidase.
Milchw. Forsch. 14, 473-475 (1932)
16. GRIMMER, W., KLEINAU, W.
Zur Kenntnis der Milchperoxidase.
Milchw. Forsch. 20, 131-138 (1939)
17. THEORELL, H., AKESON, A.
Nitrogen Distribution and Basic Amino-Acids in Horse-Radish Peroxidase and Horse-Liver Catalase, Determined by a New Micro-Method.
Arkiv. Kemi Min. Geol. 16A, 1-11 (1942)

18. THEORELL, H., PAUL, K.G.
Dissociation Constants and their Relation to the Activity in Peroxidase.
Arkiv. Kemi Min. Geol. 18A, 1-23 (1944)
19. MOSIMANN, W., SUMNER, J.B.
Salivary Peroxidase.
Arch. Biochem. 33, S. 487 (1951)
20. HUSZAK, I.
Über die Eisenporphyrinverbindungen in der Nebenniere.
Biochem. Z. 312, 330-338 (1942)
21. MÜLLER, F., SEIFERT, O., v. KRESS, H.
Methodik der Blutuntersuchung.
In: v. Kress, H.: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik.
68. Aufl., J.F. Bergmann Verlag, München, S. 450 (1962)
22. MÜLLER, F., SEIFERT, O., v. KRESS, H.
Hämaturie und Hämoglobinurie.
In: v. Kress, H.: Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik.
68. Aufl. J.F. Bergmann Verlag, München, S. 260 (1962)
23. PAUL, K.B., KUMLIEN, A., BRODY, S.
Studies on Granulocytes. II. The Effect of Cytostatics on the Uterine Response to Oestrogen.
Experientia 22, 799-800 (1966)
24. PÜTTER, J., STRUFE, K.
Eine Verbesserung der enzymetischen Bestimmung von H_2O_2 .
Anwendung auf die Glucose-Bestimmung.
Clin.Chim. Acta 15, 159-163 (1967)
25. HUGGETT, A.S.G., NIXON, D.A.
Use of Glucose Oxidase, Peroxidase and o-Dianisidine in Determination of Blood and Urinary Glucose.
Lancet 273/2, 368-370 (1957)
26. VERDIER, C.H., HJELM, M.
A Galactose-Oxidase Method for the Determination of Galac-

- tose in Blood Plasma.
Clin.Chim. Acta 7, 742-744 (1962)
27. PÜTTER, J.
Eine Methode zur Bestimmung der Katalaseaktivität mit
kleinen Substratkonzentrationen.
Z. physiol. Chem. 329, 40-51 (1962)
 28. PÜTTER, J.
Peroxidasen.
In: Methoden der enzymatischen Analyse.
2. Aufl., Bd. 1, Hgg. H.U. Bergemeyer, Verlag Chemie,
Weinheim 648-653 (1970)
 29. SAUNDERS, B.C., HOLMES-SIEDLE, A.G., STARK, B.P.
Peroxidase.
Butterworths Verlag, London, S. 159 (1964)
 30. WILLSTÄTTER, R., STOLL, A.
Über Peroxidase.
A. Liebigs Ann. 416, 21-64 (1917)
 31. BOOTH, H., SAUNDERS, B.C.
Enzymatic Oxidation of $-CH_3$ to $-CHO$.
Nature 165, S. 567 (1950)
 32. BOOTH, H., SAUNDERS, B.C.
Studies in Peroxidase Action. Part X. The Oxidation
of Phenols.
J. chem. Soc. 940-948 (1956)
 33. JANDER, G., JAHR, K.F., KNOLL, H.
Die Manganometrie.
In: Massanalyse. Sammlung Götschen Band 221/221 a
Berlin 48-70 (1963)
 34. STAUFF, J., JAENICKE, R.
Physikalische Chemie der Lösungen.
In: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Bd. 2,
Hgg. H.M. Rauen, Springer Verlag, Heidelberg 37-121 (1964)
 35. SZASZ, G.
Die Qualitätskontrolle der Messung von Enzymaktivitäten.

- KHA 44, 449-454 (1971)
36. SACHS, L.
Statistische Methoden.
Springer Verlag, Heidelberg, S. 20, 52, 84, 85 (1970)
 37. AEBI, H.
Kinetik.
In: Biochemisches Taschenbuch, 2. Aufl., Bd. 2,
Hgg. H.M. Rauen, Springer Verlag, Heidelberg,
159-192 (1964)
 38. SZASZ, G.
Die Qualitätskontrolle von Enzymaktivitätsbestimmungen
im Serum.
Z. klin. Chem. u. klin. Biochem. 8, 212-217 (1970)
 39. FREHSE, H., NIESSEN, H., TIETZ, H.
Zur Anwendung des ppm-Begriffs im Bereich sehr kleiner
Pflanzenschutzmittel-Rückstände.
Pflanzenschutz-Nachr. Bayer 15, 113-128 (1962/63)
 40. PÜTTER, J.
Persönliche Mitteilung (1974)
 41. PÜTTER, J.
Über die Anwendung der Peroxidase-Reaktion mit Di-o-
anisidin.
Habilitationsschrift an der Univ. Bonn (1964)
 42. HÜNIG, S., BALLI, H., CONRAD, H., SCHOTT, A.
Über zweistufige Redoxsysteme, II
2.2'-Azine aromatischer Heterozyklen und ihre höheren
Oxidationsstufen.
Ann. Chem. 676, 36-51 (1964)
 43. WIELINGER, H.
GOD-Perid Methode, ein neues überlegenes Verfahren
zur enzymatischen Blutzuckerbestimmung.
KHA 9, 390-391 (1970)
 44. HATI, R.N., BAL, M., DATTA, A.G.
A Potassium Iodide stimulated Peroxidase from Goat

Submaxillary Gland.

Biochem. biophys. Res. Comm. 31, 392-397 (1968)

45. PUHR, A.

Zur Bestimmung pflanzlicher Peroxidasen.

Biochem. Z. 321, 1-18 (1950)

46. DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT

Mitteilung VIII

der Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher
Arbeitsstoffe vom 27.6.1972.

53 Bonn-Bad Godesberg 1

47. STENDER, J.H.

Emergency Temporary Standards on Certain Carcinogenics.

Federal Register 38, 10929-10930 (1973)

LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am

13. VIII. 1949 als Tochter des Arztes Dr. med. J. Becker
und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Kraut-
wurm, in Plettenberg.

1955 kam ich in die Grundschule und wechselte
1959 nach dem Gymnasium in Altena, wo ich
1968 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester
1968/1969 studierte ich allgemeine Naturwissenschaften
in Marburg, im Sommersemester
1969 Oecotrophologie in Gießen.

Danach begann ich das Studium der Medizin
in Gießen, wo ich
1970 die naturwissenschaftliche und
1972 die ärztliche Vorprüfung bestand.

1973 begann ich den experimentellen Teil der
vorliegenden Arbeit in dem Institut für
Pharmakokinetik und Metabolismus des Phar-
ma-Forschungszentrums der Bayer AG, Wupper-
tal.

1975 legte ich die ärztliche Prüfung in
Gießen ab.

